

**UNIVERSIDAD DE SALAMANCA – FACULTAD DE FARMACIA**

---

**Departamento de Química Analítica, Nutrición y Bromatología**



**VNiVERSiDAD  
D SALAMANCA**

CAMPUS DE EXCELENCIA INTERNACIONAL

**Metabolitos fenólicos: preparación y evaluación de  
la actividad en sistemas modelo.**

**Sofía Martínez Gutiérrez Zetina**

Salamanca, 2019





VNIVERSIDAD  
D SALAMANCA

DPTO. QUÍMICA ANALÍTICA, NUTRICIÓN  
Y BROMATOLOGÍA  
FACULTAD DE FARMACIA

Campus *Miguel de Unamuno*-37007 Salamanca  
Teléf.: 923 294537 – Fax: 923 294515  
e-mail: [nutr@usal.es](mailto:nutr@usal.es)

Dr. Celestino Santos Buelga, Catedrático del área de Nutrición y Bromatología, Dra. Ana María González Paramás, Profesora Titular del área de Nutrición y Bromatología, y Dra. Susana González Manzano, Profesora Contratada Doctor del área de Nutrición y Bromatología, directores del trabajo “Metabolitos fenólicos: preparación y evaluación de la actividad en sistemas modelo”, realizado por Dña. **Sofía Martínez Gutiérrez Zetina** en el Dpto. de Química Analítica, Nutrición y Bromatología de la Facultad de Farmacia de la Universidad de Salamanca, AUTORIZAN la presentación del mismo al considerar que se han alcanzado los objetivos inicialmente previstos.

Salamanca, 24 de julio de 2019.



Para la realización del presente trabajo se ha contado con una beca predoctoral del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT, México) y la financiación obtenida del Ministerio de Economía y Competitividad de España a través del proyecto: “Polifenoles y metabolitos. Estudio en *C. elegans* de sus mecanismos de acción y relación con la microbiota” (AGL2015-64522-C2-R). Se agradece también la subvención recibida por el Grupo de Investigación en Polifenoles (GIP-USAL) en el marco del proyecto 0377\_IBERPHENOL\_6\_E del Programa FEDER-Interreg España-Portugal.



Me gustaría agradecer a todas las personas que han hecho posible este trabajo y que me han acompañado durante esta etapa tan importante.

En primer lugar, quisiera agradecer a Celestino Santos Buelga, a Ana María González Paramás y a Susana González Manzano, directores de esta tesis. Gracias Tino por permitirme trabajar en tu grupo, por tu dedicación, por la orientación durante todo este proceso, por tu cercanía y por la confianza depositada en mí. Gracias Ana y Susana por estar ahí en el día a día, por sus enseñanzas, disposición, interés y cariño.

Me gustaría agradecer también a María Ángeles Castro González, coordinadora del programa de doctorado, que siempre estuvo dispuesta a ayudarme.

Agradezco especialmente a Bego y a Eva por ser las mejores compañeras gusaneras que pude tener, por su apoyo, cariño y amistad dentro y fuera del laboratorio. Gracias por todo lo que he aprendido de ustedes, por su gran ayuda siempre con la mejor disposición y porque sin ustedes no hubiera sido lo mismo.

A los profesores: Concha, Julián, Maite, María Jesús, Pilar, César, Milagros, Alfonso y Rafael, les agradezco todas sus atenciones y amabilidad durante mi estancia en el departamento.

A los compañeros de laboratorio: Montse, Alba, Rebeca, Elvira, Nacho, Cris, Ana y Siyu, gracias por su apoyo, interés y por todo el tiempo compartido. Agradezco a Joaquín y a María José por toda su ayuda siempre con la mejor disposición, por sus consejos y cercanía. A las personas que han estado temporalmente en el laboratorio, especialmente a Laura Bertoni, a Lucia, a Laura Marcelloni, a Francesca, a Leydi y a Silvia, gracias por los buenos momentos, por las risas y por su amistad.

También quiero agradecer a todos los amigos que me han acogido en Salamanca: Lau, Alba, Anita, Pedro, Lucho, Mariale, Marta, Vico, Piraña, Víctor y Pablo. Gracias porque han hecho de esta etapa algo muy especial y que sin ustedes no hubiera sido lo mismo. También agradezco a Ale, a Grace, a Ingrid y a Núria que desde la distancia me mostraron su cariño. Gracias Grace por nuestras largas charlas, que me hicieron sentir más cerca de casa.

A Diego por ser la mejor persona con la pude haber compartido este periodo, gracias por todo tu cariño, amor, apoyo, paciencia y por todo lo que aprendo de ti cada día.

A mi familia por apoyarme en cada decisión y proyecto, por estar siempre presentes, aunque sea en la distancia. Gracias papás por su motivación, por su amor incondicional, por todo lo que he aprendido de ustedes, por enseñarme a ser independiente y libre. Gracias Andy y Dolores por formar parte de mi vida, por mostrarme siempre su interés y cariño. Agradezco a mis hermanas por ser mis amigas, confidentes, por compartir esta etapa tan de cerca y por todo su cariño.



*A mi familia,  
por su apoyo incondicional.*

*A Diego,  
por estar a mi lado y colmar de amor mi vida.*



El trabajo realizado en el desarrollo de esta tesis doctoral ha dado lugar a los siguientes artículos y comunicaciones a congresos:

#### **Artículos:**

González-Paramás, A.M.; Ayuda-Durán, B.; Martínez Gutiérrez-Zetina, S.; González-Manzano, S.; Santos-Buelga, C. The mechanisms behind the biological activity of flavonoids. *Current Medicinal Chemistry*. (2019), 26, 1-14.

Gutiérrez-Zetina, S.M.; González-Manzano, S.; Pérez-Alonso, J.J.; González-Paramás, A.M.; Santos-Buelga, C. Preparation and Characterization of Protocatechuic Acid Sulfates. *Molecules*. (2019), 24, 307.

#### **Comunicaciones a congresos:**

Martínez Gutiérrez-Zetina, S.; Ayuda-Durán, B.; González-Manzano, S.; González-Paramás, A.M.; Santos-Buelga, C. Evaluación de la bioactividad del ácido protocatéquico en *Caenorhabditis elegans*. II Congreso Nacional de Jóvenes Investigadores en Ciencia, Ingeniería y Tecnología de los Alimentos. León (España), 2017 Oct 19-20. (Póster). Publicado en el libro de actas del congreso pp. 87-88.

Martínez Gutiérrez-Zetina, S.; Pérez-Alonso, J.J.; Ayuda-Durán, B.; Sánchez-Hernández, E.; González-Paramás, A.M.; Santos-Buelga, C.; González-Manzano, S. Preparation of phenolic metabolites from dietary polyphenols: protocatechuic acid sulfates. I Jornadas de Jóvenes Investigadores INNOVA SALAMANCA. Salamanca (España), 2018 May 4-5. (Póster).

Sánchez-Hernández, E.; Martínez Gutiérrez-Zetina, S.; Ayuda-Durán, B.; González-Manzano, S.; González-Paramás, A.M.; Santos-Buelga, C. Evaluation of the mechanisms of action involved in the biological activity of polyphenols using an *in vivo* model. I Jornadas de Jóvenes Investigadores INNOVA SALAMANCA. Salamanca (España), 2018 May 4-5. (Oral).

Martínez Gutiérrez-Zetina, S.; Sánchez-Hernández, E.; Ayuda-Durán, B.; González-Paramás, A.M.; González-Manzano, S.; Santos-Buelga, C. Evaluation of the bioactivity of some phenolic metabolites in *Caenorhabditis elegans*. 2<sup>nd</sup>

Food Bioactives and Health Conference. Lisboa (Portugal), 2018 Sep 26-28. (Póster).

Sánchez-Hernández, E.; Martínez Gutiérrez-Zetina, S.; Ayuda-Durán, B.; González-Manzano, S.; Santos-Buelga, C.; González-Paramás, A.M. Modulation of oxidative stress resistance in *C. elegans* by phenolic metabolites from gut microbiota. 2<sup>nd</sup> Food Bioactives and Health Conference. Lisboa (Portugal), 2018 Sep 26-28. (Póster).

Martínez Gutiérrez-Zetina, S.; Sánchez-Hernández, E.; Ayuda-Durán, B.; González-Paramás, A.M.; González-Manzano, S.; Santos-Buelga, C. Effects and mechanisms of action of microbial phenolic metabolites in *Caenorhabditis elegans*. VII Spanish Worm Meeting. Castelldefels y Barcelona (España), 2019 Mar 28-29. (Póster).

Martínez Gutiérrez-Zetina, S.; González-Manzano, S.; Ayuda-Durán, B.; Sánchez-Hernández, E.; Santos-Buelga, C.; González-Paramás, A.M. Effects and molecular targets of phenolic acids on the stress resistance and lifespan in *Caenorhabditis elegans*. IX International Conference on Polyphenols and Health (ICPH). Kobe (Japón), 2019 Nov 28-Dic 01. (Póster). Aceptado.

#### **Otras comunicaciones relacionadas:**

Ayuda-Durán, B.; González-Manzano, S.; Martínez Gutiérrez-Zetina, S.; Santos-Buelga, C.; González-Paramás, A.M. Influencia de epicatequina sobre el estado oxidativo de *Caenorhabditis elegans*. II Congreso Nacional de Jóvenes Investigadores en Ciencia, Ingeniería y Tecnología de los Alimentos. León (España), 2017 Oct 19-20. (Póster). Publicado en el libro de actas del congreso pp. 79-80.

Sánchez-Hernández, E.; Ayuda-Durán, B.; Martínez Gutiérrez-Zetina, S.; González-Manzano, S.; Santos-Buelga, C.; González-Paramás, A.M. *C. elegans* as a model on the viability and modulation of oxidative stress in a dual bacteria/polyphenols system. VII Spanish Worm Meeting. Castelldefels y Barcelona (España), 2019 Mar 28-29. (Oral).

Ayuda-Durán, B.; González-Manzano, S.; Martínez Gutiérrez-Zetina, S.; Sánchez-Hernández, E.; Santos-Buelga, C.; González-Paramás, A.M. Mechanisms of action involved in the effects of phenolic compounds of the diet. Evaluation in *C. elegans*. II Jornadas de Jóvenes Investigadores INNOVA SALAMANCA. Salamanca (España), 2019 Sep 26-27. (Oral). Aceptado.

Sánchez-Hernández, E.; Ayuda-Durán, B.; Martínez Gutiérrez-Zetina, S.; González-Manzano, S.; Santos-Buelga, C.; González-Paramás, A.M. Modulation of oxidative stress by a dual bacteria/polyphenol system in the organism model *C. elegans*. II Jornadas de Jóvenes Investigadores INNOVA SALAMANCA. Salamanca (España), 2019 Sep 26-27. (Oral). Aceptado.

Ayuda-Durán, B.; González-Manzano, S.; Martínez Gutiérrez-Zetina, S.; Sánchez-Hernández, E.; González-Paramás, A.M.; Santos-Buelga, C. Exploring target genes involved in the effects of quercetin on response to stress in *Caenorhabditis elegans*. IX International Conference on Polyphenols and Health (ICPH). Kobe (Japón), 2019 Nov 28-Dic 01. (Póster). Aceptado.

Ayuda-Durán, B.; González-Manzano, S.; Martínez Gutiérrez-Zetina, S.; Sánchez-Hernández, E.; Santos-Buelga, C.; González-Paramás, A.M. Molecular targets of epicatechin: gene expression assessment in *Caenorhabditis elegans*. IX International Conference on Polyphenols and Health (ICPH). Kobe (Japón), 2019 Nov 28-Dic 01. (Oral). Aceptado.

Sánchez-Hernández, E.; Ayuda-Durán, B.; Martínez Gutiérrez-Zetina, S.; González-Manzano, S.; González-Paramás, A.M.; Santos-Buelga, C. Modulation of oxidative stress by dual probiotics/polyphenols systems in *C. elegans*. IX International Conference on Polyphenols and Health (ICPH). Kobe (Japón), 2019 Nov 28-Dic 01. (Póster). Aceptado.



## ABREVIATURAS

**3-4HPA:** ácido 3-(4-hidroxifenil)-propiónico

**ABC:** *ATP-Binding Cassette*

**ARE:** elementos de respuesta antioxidante

**BCRP:** *Breast Cancer Resistant Protein*

**CA:** ácido 3,4-dihidroxicinámico (= ácido cafeico)

**CAPE:** ester fenetílico del ácido caféico

**CAT:** catalasa

**CBG:**  $\beta$ -glucosidasa citosólica

**CE:** energía de colisión

**CND:** cordón nervioso dorsal

**CNV:** cordón nervioso ventral

**COMT:** catecol-O-metiltransferasas

**COSY:** espectroscopia de correlación (*Correlation Spectroscopy*)

**COX-2:** ciclooxigenasa-2

**Ct:** ciclo umbral (*threshold cycle*)

**DAD:** detector de espectrofotometría de diodos

**DBEs:** elementos de unión de DAF-16 (*DAF-16 Binding Elements*)

**DCF:** diclorofluoresceína

**DCFH:** 2',7'-diclorodihidrofluoresceína

**DCFH-DA:** 2',7'-diclorodihidrofluoresceína diacetato

**DHCA:** ácido 3-(3,4-dihidroxifenil)-propiónico (= ácido dihidrocafeico)

**DHE:** dihidroetidio

**DHPAA:** ácido 3,4-dihidroxifenilacético

**DMSO:** dimetilsulfóxido

**DP:** *Declustering Potential*

**ECV:** enfermedades cardiovasculares

**EGCG:** epigallocatequina-3-O-galato

**EMS:** *Enhanced MS*

**eNOS:** NOS endotelial

**EP:** potencial de entrada

**EPI:** *Enhanced Product Ion*

**EpRE:** elementos de respuesta a electrófilos

**ERK:** quinasas reguladas por señales extracelulares

**ESI:** sonda de ionización por electrospray

**FoxO:** *Forkhead box O*

**FUdR:** 5-fluoro-2'-desoxiuridina

**GPx:** glutatión peroxidasa

**GR:** glutatión reductasa

**GSH:** glutatión

**GST:** glutatión-S-transferasa

**H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>:** peróxido de hidrógeno

**HDL:** lipoproteínas de alta densidad

**HMBC:** correlación heteronuclear de enlaces múltiples (*Heteronuclear Multiple-Bond Correlation*)

**HPLC:** cromatografía líquida de alta eficacia

**HSB-1:** proteína de unión al factor HSF-1

**HSEs:** elementos de choque térmico (*Heat Shock Elements*)

**HSF:** factor de transcripción de choque térmico

**HSP:** proteínas de choque térmico

**HSQC:** correlación heteronuclear cuántica simple (*Heteronuclear Single Quantum Coherence*)

**ICAM-1:** molécula de adhesión intercelular 1

**IGF-1:** factor de crecimiento similar a insulina tipo 1 (*Insulin-like Growth Factor*)

**IIS:** señalización por insulina/IGF-1 (*Insulin/IGF-1 Signaling*)

**ILPs:** péptidos de tipo a la insulina

**IRS:** sustratos del receptor de insulina

**JNK:** quinasas c-Jun N-terminal (*Jun N-terminal Kinases*)

**LDL:** lipoproteínas de baja densidad

**LDL-ox:** lipoproteínas de baja densidad oxidadas

**LOO:** peroxilo lipídico

**LPH:** lactasa-floricín hidrolasa

**MAPK:** proteínas quinasas activadas por mitógenos (*Mitogen-Activated Protein Kinases*)

**MRP:** proteínas de resistencia a múltiples fármacos (*Multidrug Resistance Proteins*)



**MS:** espectrometría de masas

**NAD:** nicotinamida adenina dinucleótido

**NADPH:** nicotidamida adenina dinucleótido fosfato

**NF- $\kappa$ B:** factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas

**NF-kB:** factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas

**NGM:** *Nematode Growth Medium*

**NO<sup>•</sup>:** óxido nítrico

**NO<sub>2</sub><sup>•</sup>:** dióxido de nitrógeno

**NOS:** enzima óxido nítrico sintasa

**NQO-1:** NAD(P)H-quinona oxidoreductasa

**Nrf2:** factor relacionado con el factor nuclear eritroide-2 (*Nuclear Factor-Erythroid 2-Related Factor-2*)

**O<sub>2</sub><sup>•-</sup>:** anión superóxido

**<sup>•</sup>OH:** radical hidroxilo

**OMS:** Organización Mundial de la Salud

**ONOO<sup>-</sup>:** peroxinitrito

**PBS:** buffer fosfato salino

**PCA:** ácido 3,4-dihidroxibenzoico (= ácido protocatéquico)

**PCR:** reacción en cadena de la polimerasa

**PI3K:** quinasa-3-OH fosfatidilinositol

**PREDIMED:** Prevención con Dieta Mediterránea

**qPCR:** PCR cuantitativa a tiempo real

**RMN:** resonancia magnética nuclear

**RNS:** especies reactivas de nitrógeno

**ROO<sup>•</sup>:** radical peroxilo

**ROS:** especies reactivas de oxígeno

**RT:** transcripción reversa

**SGLT1:** transportador de glucosa dependiente de sodio

**sHSP:** HSP pequeñas

**SOD:** superóxido dismutasa

**SULT:** sulfotransferasas

**TCE:** clorosulfato de tricloroetilo

**TFA:** ácido trifluoroacético

**UGTs:** uridin-5'-difosfato glucuronosiltransferasas

**VA:** ácido 3-metoxi-4-hidroxibenzoico (= ácido vanílico)

**VCAM-1:** molécula de adhesión celular vascular 1

**XO:** xantina oxidasa

**$\alpha$ -T:**  $\alpha$ -tocoferol

**$\alpha$ -T $\cdot$ :** radicales tocoferoxilos

# *ÍNDICE*



<b>I. INTERÉS Y OBJETIVOS</b>	<b>1</b>
<b>II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA</b>	<b>7</b>
<b>2.1 Compuestos fenólicos</b>	<b>9</b>
2.1.1 Descripción y características generales	9
2.1.2 Clasificación, estructura y presencia en los alimentos	11
2.1.2.1 Flavonoides	11
2.1.2.2 No flavonoides	15
2.1.3 Compuestos fenólicos y salud	18
2.1.3.1 Consumo de compuestos fenólicos en la dieta	19
2.1.3.2 El rol de los compuestos fenólicos en la salud humana	20
2.1.3.3 Compuestos fenólicos y salud cardiovascular	21
2.1.3.4 Compuestos fenólicos y salud neuronal	23
2.1.3.5 Compuestos fenólicos y cáncer	24
2.1.4 Biodisponibilidad y metabolismo de los compuestos fenólicos	25
2.1.4.1 Absorción y metabolismo	26
2.1.4.2 Transformación de los compuestos fenólicos por la microbiota intestinal	29
2.1.4.3 Biodisponibilidad de los metabolitos fenólicos microbianos	33
2.1.4.4 Modulación de la microbiota intestinal por los compuestos fenólicos de la dieta	38
2.1.5 Actividad antioxidante	39
2.1.5.1 Captación de ROS	40
2.1.5.2 Actividad quelante de metales	42
2.1.5.3 Capacidad para modular enzimas relacionadas con mecanismos de actividad antioxidante	43
2.1.5.4 Interacción con otros antioxidantes	44
2.1.6 Mecanismos moleculares implicados en envejecimiento y respuesta a estrés	45
2.1.6.1 Ruta de señalización de la insulina/IGF-1	46
2.1.6.2 Vía de señalización SIR-2.1/SIRT1	49
<b>2.2 <i>Caenorhabditis elegans</i></b>	<b>50</b>
2.2.1 Características generales	50
2.2.2 Anatomía	52

2.2.2.1 Morfología	52
2.2.2.2 Sistema nervioso	53
2.2.2.3 Sistema inmune	53
2.2.2.4 Sistema digestivo	54
2.2.2.5 Sistema excretor	54
2.2.2.6 Sexo y sistema reproductor	54
2.2.3 Ciclo de vida	56
2.2.4 <i>Caenorhabditis elegans</i> como organismo modelo	57
2.2.5 Estudios sobre compuestos fenólicos en <i>Caenorhabditis elegans</i> y otros modelos	58
2.2.5.1 Ácido protocatéquico	62
2.2.5.2 Ácido vanílico	63
2.2.5.3 Ácido 3,4-dihidroxifenilacético	64
2.2.5.4 Ácido 3-(4-hidroxifenil)-propiónico	64
2.2.5.5 Ácido dihidrocafeico	65
2.2.5.6 Ácido cafeico	65
<b>III. MATERIALES Y MÉTODOS</b>	<b>67</b>
<b>3.1 Materiales y Equipos</b>	<b>69</b>
3.1.1 Equipos	69
3.1.2 Materiales, reactivos y disolventes	70
3.1.3 Material biológico	71
<b>3.2 Métodos</b>	<b>72</b>
3.2.1 Preparación del medio de cultivo para <i>Caenorhabditis elegans</i> ( <i>Nematode Growth Medium</i> , NGM)	72
3.2.2 Preparación de <i>Escherichia coli</i> OP50 como fuente de alimento	72
3.2.3 Sembrado de <i>Caenorhabditis elegans</i> en placas NGM	73
3.2.4 Sincronización de <i>Caenorhabditis elegans</i>	73
3.2.5 Preparación de placas Petri para ensayos con metabolitos fenólicos	74
3.2.6 Ensayos de estrés oxidativo inducido térmicamente	75
3.2.7 Ensayos de determinación de especies reactivas de oxígeno (ROS)	75
3.2.7.1 Ensayos con DCFH-DA	75
3.2.7.2 Ensayos con MitoSOX	76

3.2.8 Ensayos de longevidad	77
3.2.9 Cuantificación de ARNm por RT-PCR cuantitativa	77
3.2.9 Análisis estadísticos	79
3.2.10 Preparación de sulfatos de PCA	79
3.2.11 Análisis por HPLC-DAD-MS	80
3.2.12 Análisis por RMN	81
<b>IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b>	<b>83</b>
<b>4.1 Ensayos de optimización del método de análisis de superóxido en <i>C. elegans</i> mediante el reactivo MitoSOX</b>	<b>85</b>
<b>4.2 Estudios con ácido protocatéquico</b>	<b>88</b>
4.2.1 Ensayos de estrés térmico	89
4.2.2 Determinación de niveles intracelulares de ROS	93
4.2.3 Ensayos de longevidad	99
4.2.4 Conclusiones parciales	101
<b>4.3 Estudios con ácido vanílico</b>	<b>103</b>
4.3.1 Ensayos de estrés térmico	104
4.3.2 Determinación de niveles intracelulares de ROS	106
4.3.3 Conclusiones parciales	109
<b>4.4 Estudios con ácido 3,4-dihidroxifenilacético</b>	<b>111</b>
4.4.1 Ensayos de estrés térmico	112
4.4.2 Determinación de niveles intracelulares de ROS	116
4.4.2 Conclusiones parciales	120
<b>4.5 Estudios con ácido cafeico</b>	<b>121</b>
4.5.1 Ensayos de estrés térmico	122
4.5.2 Determinación de los niveles intracelulares de ROS con los reactivos DCFH-DA y MitoSOX	126
4.5.2 Estudios de longevidad	131
4.5.3 Estudio de los mecanismos moleculares implicados en los efectos biológicos del ácido cafeico	133
4.5.3 Conclusiones parciales	142

<b>4.6 Estudios con ácido dihidrocafeico</b>	<b>144</b>
4.6.1 Ensayos de estrés térmico	145
4.6.2 Determinación de los niveles intracelulares de ROS con los reactivos DCFH-DA y MitoSOX	148
4.6.3 Estudios de longevidad	153
4.6.4 Estudio de los mecanismos moleculares implicados en los efectos del ácido dihidrocafeico	154
4.6.3 Conclusiones parciales	156
<b>4.7 Estudios con ácido 3-(4-hidroxifenil)-propiónico</b>	<b>158</b>
4.7.1 Ensayos de estrés térmico	159
4.7.2 Determinación de niveles intracelulares de ROS	160
4.5.2 Conclusiones parciales	162
<b>4.8 Preparación y caracterización de sulfatos del ácido protocatéquico</b>	<b>164</b>
4.8.1 Preparación de sulfatos de PCA	166
4.8.2 Características espectrales de absorción y de masas de los sulfatos de PCA	167
4.8.3 Análisis por RMN	169
4.8.4 Estabilidad de los sulfatos liofilizados	173
4.8.5 Conclusiones parciales	174
<b>V. CONCLUSIONES</b>	<b>175</b>
<b>VI. BIBLIOGRAFÍA</b>	<b>179</b>
<b>VII. ANEXO</b>	<b>215</b>



*I. INTERÉS Y  
OBJETIVOS*



Diversos estudios epidemiológicos han establecido una relación entre la ingesta de alimentos ricos en compuestos fenólicos y una menor incidencia de distintas patologías crónicas. Sin embargo, la contribución real de estos compuestos en el mantenimiento de la salud y los mecanismos subyacentes a su actividad biológica siguen sin esclarecerse. Los efectos sistémicos de los compuestos fenólicos se han relacionado tradicionalmente con sus propiedades antioxidantes, es decir atribuible a su capacidad reductora y captadora de radicales libres. Sin embargo, a medida que se ha avanzado en el conocimiento de su biodisponibilidad y metabolismo han surgido interrogantes sobre cuáles son los mecanismos de acción realmente implicados en la actividad biológica *in vivo* de estos compuestos (Williamson, 2017).

En general, la absorción de los compuestos fenólicos en el intestino delgado es baja, por lo que llegan prácticamente inalterados al colon, en donde son transformados por la microbiota, originando metabolitos de bajo peso molecular (ácidos fenólicos principalmente), que pueden ser parcialmente absorbidos en el intestino grueso. Los compuestos captados, ya sea en el intestino delgado o en el colon, son adicionalmente biotransformados en los enterocitos y/o en el hígado hacia formas conjugadas (glucurónidos, sulfatos y derivados metilados) (Cardona et al., 2013). Las bajas concentraciones de estos metabolitos que pueden alcanzarse tanto a nivel plasmático como tisular (de orden nanomolar), unido al hecho de que las formas conjugadas poseen menor capacidad antioxidante que los compuestos originales, ponen en duda que el efecto antioxidante directo pueda jugar un papel destacado en la actividad *in vivo* de los compuestos fenólicos (Kawabata et al., 2019). Los estudios más recientes apuntan a que, al menos en el caso de los flavonoides, los efectos antioxidantes *in vivo* podrían estar más relacionados con mecanismos de acción indirecta, especialmente con su capacidad para modular la actividad de enzimas endógenas, tanto de naturaleza antioxidante (catalasa, glutatión peroxidasa, glutatión reductasa, superóxido dismutasa) como oxidante (xantino-oxidasa, cliclooxigenasa, lipooxigenasa, NADPH oxidasa), junto con la posibilidad de intervenir en procesos de señalización celular regulando la expresión génica a diferentes niveles (González-Paramás et al., 2019).

Para intentar responder a algunos de estos interrogantes, en el presente trabajo se han realizado una serie de estudios utilizando el organismo modelo *Caenorhabditis elegans*. Este nematodo es el organismo multicelular mejor caracterizado a nivel genómico, embriológico, neurobiológico y celular, y fue el primero de los eucariotas multicelulares para los que se secuenció completamente el genoma. Su fácil manejo, su bajo coste y su ciclo de vida corto permiten la rapidez y facilidad de trabajo de un microorganismo, pero con las ventajas de un modelo animal. Por estas razones, en los últimos años, se ha venido utilizando para estudiar la relación existente entre diferentes compuestos fenólicos y el estrés oxidativo, el metabolismo calórico y la longevidad (Koch et al., 2014; Shen, P. et al., 2018). En particular, en este trabajo se han explorado los efectos sobre el gusano de diversos ácidos fenólicos, identificados como metabolitos de la degradación de polifenoles por la microbiota intestinal, así como la implicación de algunos genes relacionados con longevidad y resistencia a estrés oxidativo en los efectos observados. Además, se han iniciado los estudios para la preparación de derivados conjugados de ácidos fenólicos, ya que los mismos podrían representar una fracción relevante de los metabolitos circulantes en plasma tras el consumo de productos ricos en compuestos fenólicos y, por tanto, contribuir a sus efectos en el organismo. Este tipo de metabolitos no están disponibles comercialmente y disponer de los mismos es importante para poder evaluar su actividad biológica en sistemas modelo.

## OBJETIVOS

El **objetivo general** de esta tesis doctoral es profundizar en la implicación de los metabolitos fenólicos microbianos en los mecanismos subyacentes a la actividad biológica de los compuestos fenólicos de los alimentos, utilizando *C. elegans* como modelo.

Los **objetivos específicos** que se proponen con esta finalidad son los siguientes:

1. Evaluar la influencia de diversos ácidos fenólicos identificados como metabolitos de la degradación de polifenoles por la microbiota intestinal sobre la resistencia de *C. elegans* al daño oxidativo.
2. Evaluar la influencia de algunos de estos ácidos fenólicos sobre la longevidad en *C. elegans*.
3. Estudiar la capacidad de los ácidos fenólicos para modular los niveles de especies reactivas de oxígeno en *C. elegans*.
4. Explorar la implicación de genes y factores de transcripción relacionados con longevidad y resistencia a estrés en la respuesta al tratamiento de *C. elegans* con ácidos fenólicos.
5. Avanzar en la preparación de derivados conjugados de ácidos fenólicos que puedan encontrarse como metabolitos circulantes en el organismo humano.



*II. REVISIÓN  
BIBLIOGRÁFICA*





## 2.1 Compuestos fenólicos

### 2.1.1 Descripción y características generales

Los compuestos fenólicos o polifenoles existen en la naturaleza como metabolitos secundarios en el reino vegetal. Son sintetizados por las rutas del ácido shikímico/fenilpropanoide, del acetato/malonato o combinación de ambas y están involucrados en diferentes funciones de la ecofisiología vegetal. Participan en mecanismos de protección frente a situaciones de estrés como son la agresión de patógenos o predadores y la radiación de luz ultravioleta. Además, funcionan como agentes atrayentes para polinizadores y animales que dispersan semillas, y son moléculas de señalización en la fijación de nitrógeno (Del Rio et al., 2013).

Se han descrito alrededor de 10.000 compuestos fenólicos y aunque pueden ser muy diferentes en su estructura, se caracterizan por poseer al menos un anillo aromático con uno o más grupos hidroxilo unidos (Potì et al., 2019). Pueden variar desde moléculas simples, como los ácidos fenólicos, hasta compuestos altamente polimerizados, como los taninos condensados (Bravo, 1998). En la Tabla II.1 se recogen los principales grupos de compuestos fenólicos.

Los compuestos fenólicos en la naturaleza se pueden encontrar de forma libre (aglicones) o como derivados glicosilados, acilados o prenilados. En tejidos vegetales y alimentos, los ácidos fenólicos forman habitualmente combinaciones con polioles, como glucosa o ácido quínico, mientras que flavonoides, al igual que lignanos o estilbenos, existen principalmente en forma glicosilada, excepto en el caso de los flavan-3-oles, que suelen encontrarse como aglicones. Los azúcares se unen al flavonoide normalmente a través de enlaces éter entre los grupos hidroxilo, aunque en algunos casos también pueden estar enlazados a un átomo de carbono aromático. El azúcar más habitual es glucosa, pero también son comunes ramnosa, galactosa y arabinosa, y los disacáridos neohesperidosa ( $\alpha$ -1-ramnopiranosil-(1 $\rightarrow$ 2)- $\beta$ -d-glucopiranososa) y rutinosa ( $\alpha$ -1-ramnopiranosil-(1 $\rightarrow$ 6)- $\beta$ -d-glucopiranososa). Los azúcares pueden estar adicionalmente esterificados con ácidos alifáticos (p.ej., ácidos malónico o acético) o aromáticos

(p.ej., ácidos *p*-cumárico, cafeico o ferúlico) (Santos-Buelga y González-Paramás, 2014).

Los compuestos fenólicos constituyen una parte importante de la dieta humana por su ubicuidad en los alimentos de origen vegetal. Están presentes en distintas concentraciones en estos y son en gran parte responsables de las características organolépticas de los alimentos que los contienen (Bravo, 1998). Sin embargo, su importancia va más allá de estas cualidades. Existe cada vez más evidencia de que la ingesta moderada de estos compuestos a largo plazo puede tener beneficios para la salud humana en la prevención o reducción del riesgo de diferentes enfermedades crónicas (Jaganath y Crozier, 2010; Fraga et al., 2019).

**Tabla II.1.** Principales grupos de compuestos fenólicos.

Fuente: Modificado de Zhou et al. (2016).

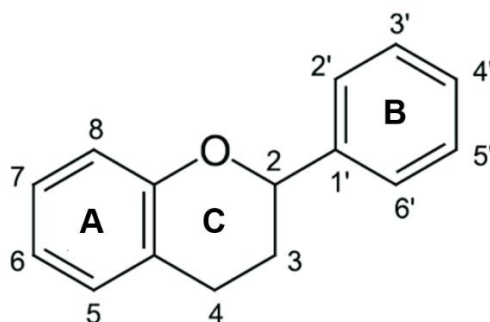
Clasificación		Ejemplos representativos	Principales fuentes en la dieta
Flavonoides	Antocianos	Cianidina, delphinidina, malvidina	Bayas, uvas, cerezas, ciruelas, granadas
	Flavan-3-oles	Epicatequina, epigallocatequina, proantocianidinas	Manzanas, peras, legumbres, té, cacao, vino tinto
	Flavanonas	Hesperidina, naringenina	Frutas cítricas
	Flavonas	Apigenina, luteolina, crisina	Perejil, apio, naranjas, miel, especias
	Flavonoles	Quercetina, kaempferol, miricetina, isoramnetina, galangina	Cebolla, bayas, manzanas, brócoli, té
	Isoflavonas	Genisteína, daidzeína	Soja
Ácidos fenólicos	Ácidos hidroxibenzoicos	Ácido gálico, ácido elágico, ácido protocatéquico	Granadas, uvas, bayas, nueces, vino, té verde
	Ácidos hidroxicinámicos	Ácido clorogénico, ácido ferúlico, ácido cafeico	Café, cereales
Lignanós		Sesamina, secoisolariciresinol	Semillas de lino, sésamo
Estilbenos		Resveratrol	Uvas, bayas, vino tinto
Alcoholes fenólicos		Tirosol, hidroxitirosol	Aceite de oliva

### 2.1.2 Clasificación, estructura y presencia en los alimentos

De acuerdo a sus características estructurales los compuestos fenólicos se clasifican como flavonoides y no flavonoides. Dentro del grupo de los no flavonoides se encuentran los ácidos fenólicos, los estilbenos, los lignanos y los alcoholes fenólicos (Tabla II.1) (Parkinson y Cicerale, 2016). Los flavonoides y los ácidos fenólicos son los grupos más abundantes de compuestos fenólicos en la naturaleza, representando el 60 % y el 30 % de ellos respectivamente (Zhou et al., 2016).

#### 2.1.2.1 Flavonoides

La estructura básica de los flavonoides está compuesta por 15 átomos de carbono que forman dos anillos aromáticos (anillos A y B), unidos por un esqueleto de tres átomos de carbono (C6-C3-C6) que en la mayoría de las subclases está formando un tercer anillo heterocíclico (anillo C) (Figura II.1) (Jaganath y Crozier, 2010). Así, de acuerdo con el patrón de sustitución que presenten en el anillo C se pueden dividir en flavonoles, flavonas, flavan-3-oles, antocianos, flavanonas e isoflavonas, principalmente (Figura II.2). Otros grupos de flavonoides que se encuentran en menor proporción en la dieta son calconas, dihidrocalconas, dihidroflavonoles, flavan-3,4-dioles, cumarinas, y auronas (Del Rio et al., 2013).

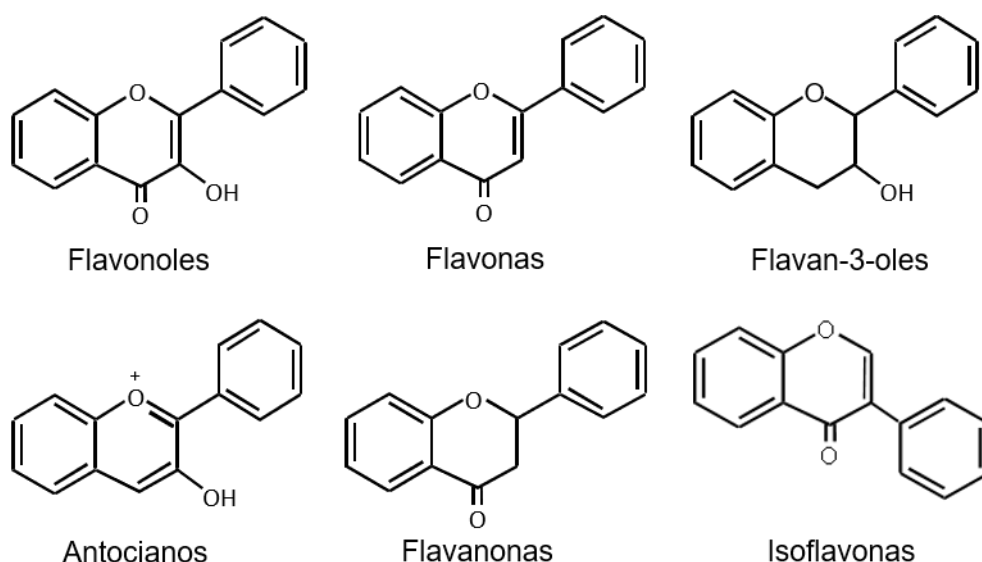


**Figura II.1.** Estructura general de un flavonoide.

Los flavonoides se encuentran diversamente hidroxilados, siendo las posiciones más habituales 3, 5, 7, 3', 4' o 5'. La mayoría de estos compuestos existen naturalmente en forma glicosilada (O-glicósidos y C-glicósidos), aunque también pueden aparecer como aglicones libres y en formas conjugadas

(metilados, acetilados, prenilados o sulfatados). Algunos flavonoides se encuentran formando estructuras oligómeras o polímeras, como es el caso de los taninos condensados (o proantocianidinas) compuestos por la unión de un número variable de unidades flavan-3-ol (Santos-Buelga y González-Paramás, 2014).

Los flavonoides están ampliamente distribuidos en alimentos y bebidas de origen vegetal, por lo que constituyen una parte muy importante de la dieta. Se encuentran especialmente en frutas, legumbres, cereales, verduras y productos derivados, como té, chocolate, zumos, vino o cerveza (Jaganath y Crozier, 2010). El té verde y negro, el vino tinto y el chocolate representan los productos con contenido relevante de flavonoides más consumidos a nivel mundial (Santos-Buelga y González-Paramás, 2016).



**Figura II.2.** Estructuras básicas de los principales grupos de flavonoides.

El subgrupo de flavonoides más ubicuo en los alimentos es el de los **flavonoles**, siendo quercetina el compuesto más representativo. Derivados de este flavonol se encuentran en altas concentraciones en la cebolla (200-1000 µg/g de peso fresco) y en diferentes frutas y hortalizas como son fresa (40 µg/g), espinaca (19 µg/g) o coliflor (18 µg/g), entre otros. Kaempferol y miricetina son otros flavonoles bien representados en la dieta, estando presentes, por ejemplo, en kiwis o en diferentes bayas, respectivamente. Además, las uvas de *Vitis*

*vinifera* y productos derivados como los vinos contienen una amplia gama de flavonoles, así como el té y las manzanas (Jaganath y Crozier, 2010).

Las **flavonas** están representadas principalmente por apigenina, luteolina y crisina. A diferencia de los flavonoles, su distribución es más limitada, ya que solo se han reportado concentraciones significativas en apio, perejil y en algunas hierbas empleadas como condimentos (Del Rio et al., 2013).

Los **flavan-3-oles** representan el subgrupo de flavonoides más consumido en la dieta occidental. Su presencia en alimentos influye sobre algunas propiedades organolépticas, como la astringencia, el amargor, la acidez, o la definición del color (Jaganath y Crozier, 2010). Los flavan-3-oles son la subclase de flavonoides más compleja ya que incluyen desde monómeros simples, como catequina y epicatequina, hasta compuestos oligómeros y polímeros (proantocianidinas o taninos condensados). El tipo más abundante de proantocianidinas son las procianidinas, que consisten exclusivamente en unidades de (epi)catequina (Del Rio et al., 2013). Las prodelfinidinas, que contienen unidades (epi)galocatequina, están menos representadas en alimentos, encontrándose, por ejemplo, en uvas y vino tinto (Santos-Buelga y Scalbert, 2000).

Los flavan-3-oles monómeros se suelen nombrar genéricamente como "catequinas" y se diferencian entre ellos según la configuración de los carbonos asimétricos y el grado de hidroxilación de su anillo B. Los principales flavan-3-oles monómeros son catequina, epicatequina, galocatequina, epigalocatequina y sus galoil derivados, (epi)catequina-3-O-galato y (epi)galocatequina-3-O-galato (De Pascual-Teresa et al., 2010). Las catequinas se encuentran en muchos tipos de frutas, como los albaricoques, que pueden contener 250 mg/kg de peso fresco. También están presentes en el vino tinto con hasta 300 mg/L. Sin embargo, el té verde y el chocolate son las fuentes dietéticas más ricas de estos compuestos, una infusión de té verde contiene hasta 200 mg de catequinas. El té negro contiene menos flavan-3-oles monoméricos, ya que estos se oxidan durante la fermentación de las hojas de té a compuestos fenólicos condensados más complejos conocidos como teaflavinas (dímeros) y tearubiginas (polímeros). Catequina y epicatequina son los principales flavan-3-oles en frutas, mientras que galocatequina, epigalocatequina y galato de

epigallocatequina se encuentran en ciertas plantas leguminosas, en uvas y en té. A diferencia de otras clases de flavonoides, los flavan-3-oles no están glicosilados en los alimentos (Santos-Buelga y Scalbert, 2000).

Las proantocianidinas son las principales responsables del carácter astringente de las frutas (uvas, melocotones, kakis, manzanas, peras, bayas, etc.) y bebidas (vino, sidra, té, cerveza, etc.) y contribuyen también al amargor de productos como el chocolate, a través de la formación de complejos con proteínas salivales. Esta astringencia cambia a lo largo de la maduración y a menudo desaparece cuando la fruta alcanza la madurez, durante la cual aumenta el grado de polimerización (Manach et al., 2004).

Los **antocianos** más comunes son cianidina, delphinidina y malvidina, que forman conjugados con azúcares y ácidos orgánicos, generando compuestos de diferentes colores, que van desde el naranja y rojo, hasta al azul y morado. Son particularmente evidentes en frutas y flores (Del Rio et al., 2013). En la dieta humana, los antocianos se encuentran de manera abundante en frutas, como las bayas, a las que proporcionan sus colores distintivos. También están presentes en el vino tinto, en ciertas variedades de cereales y en algunas hortalizas, como berenjenas, coles, cebollas o rábanos. El contenido de estos compuestos en los alimentos es generalmente proporcional a la intensidad del color, pudiendo alcanzar valores de hasta 2-4 g/kg de peso fresco en grosellas negras o en moras. El vino tinto puede contener desde 200 a más de 500 mg/L de antocianos, pudiéndose transformar en varias estructuras complejas a medida que el vino envejece (Manach et al., 2004).

Las **flavanonas** están representadas principalmente por naringenina, hesperetina y eriodictiol, encontrándose fundamentalmente en frutas cítricas. Los zumos de pomelo y naranja contienen hasta 377 mg/L y entre 16-84 mg/L de naringenina, respectivamente. En los cítricos, las flavanonas se encuentran únicamente en su forma glicosilada y se localizan especialmente en la cáscara (Jaganath y Crozier, 2010).

Las **isoflavonas** tienen una distribución muy limitada. Se encuentran casi exclusivamente en leguminosas y presentan una estructura similar a los estrógenos. Tienen grupos hidroxilo en las posiciones 7 y 4' en una configuración

análoga a la de los grupos hidroxilos en la molécula de estradiol, cualidad que les confiere propiedades pseudohormonales, incluida la capacidad de unirse a los receptores de estrógeno, y en consecuencia se suelen clasificar como fitoestrógenos. La soja y sus productos procesados son la principal fuente de isoflavonas en la dieta humana. Siendo las moléculas más comunes presentes en estos, genisteína, daidzeína y gliciteína (Manach et al., 2004).

#### 2.1.2.2 No flavonoides

##### a) Ácidos fenólicos

Los ácidos fenólicos se caracterizan estructuralmente por poseer un anillo aromático y un grupo carboxilo. Se distribuyen ampliamente en el reino vegetal y se encuentran en una gran variedad de frutas, como frambuesas, uvas, fresas, arándanos y grosellas negras. En alimentos se encuentran principalmente dos tipos de estos compuestos: los ácidos hidroxibenzoicos (C6-C1) y los ácidos hidroxicinámicos (C6-C3) (Saibabu et al., 2015).

Los **ácidos hidroxibenzoicos** están representados principalmente por los ácidos gálico, *p*-hidroxibenzoico, protocatéquico (PCA), vanílico (VA), elágico y siríngico (Figura II.3). Estos compuestos se pueden encontrar como tales ácidos libres, unidos a azúcares o ácidos orgánicos o formando parte de estructuras más complejas como las ligninas y los taninos hidrolizables (Jaganath y Crozier, 2010).

El ácido gálico es uno de los compuestos de este grupo mejor representado en alimentos, siendo el té una fuente importante, que puede contener hasta 4,5 g/kg de peso fresco (Manach et al., 2004). El zumo de granada es rico en ácido galágico, que es un análogo del ácido elágico que contiene cuatro residuos de ácido gálico, y punicalagina, el principal tanino hidrolizable, en el que el ácido galágico forma un complejo con la glucosa (Jaganath y Crozier, 2010).

El ácido protocatéquico se encuentra de forma natural en cebollas, en diferentes frutas como en ciruelas, grosellas, uvas y las frambuesas, así como en nueces. Está también presente en distintas especias, como anís estrellado (*Illicium verum*), toronjil (*Melissa officinalis*), y romero (*Rosmarinus officinalis*), y

es un componente activo de algunas plantas medicinales, como las flores del *Hibiscus sabdariffa* (Flor de hibisco o de Jamaica), *Ginkgo biloba* o *Hypericum perforatum*. Constituye, asimismo, un metabolito importante de la degradación de flavonoides por la microbiota colónica (Kakkar y Bais, 2014; Khan et al., 2015).

Los granos de diferentes cereales como, sorgo, mijo, cebada, trigo, arroz, avena y centeno, contienen ácidos fenólicos diversos como gálico, PCA, *p*-hidroxibenzoico, gentísico, salicílico, VA o siríngico (Jaganath y Crozier, 2010).

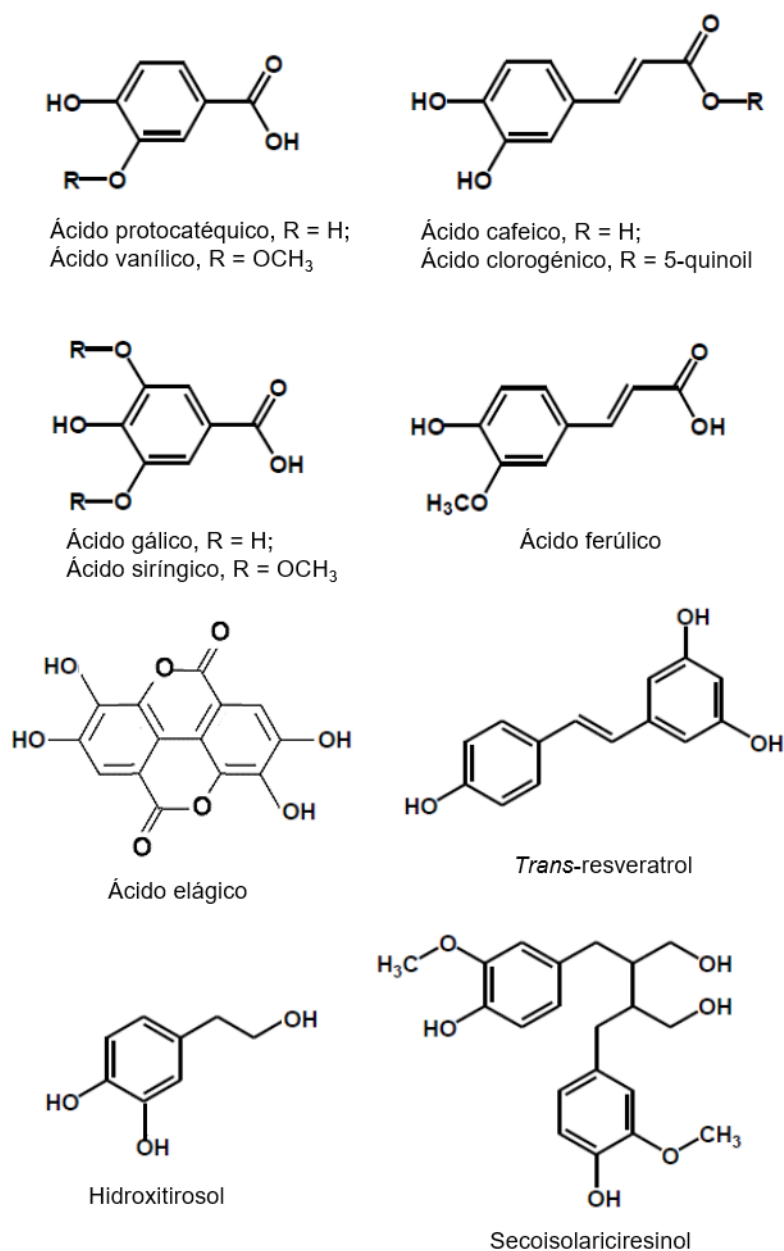


Figura II.3. Estructura química de compuestos fenólicos no flavonoides.



**Los ácidos hidroxicinámicos** son más comunes en la naturaleza que los ácidos hidroxibenzoicos. Dentro de este grupo destacan los ácidos *p*-cumárico, cafeico, ferúlico y sinápico, que pueden encontrarse en forma libre o conjugada. Los ácidos cafeico y quínico se combinan para formar ácido clorogénico (Figura II.3), que se encuentra en muchos tipos de fruta y en altas concentraciones en el café (70-350 mg de ácido clorogénico por taza). Los tipos de fruta que tienen el mayor contenido de ácidos hidroxicinámicos y derivados son arándanos, kiwis, ciruelas, cerezas, peras y manzanas, donde pueden alcanzar valores de hasta 0,5-2 g/kg de peso fresco. El ácido ferúlico es el ácido fenólico más abundante en los granos de cereales, constituyendo su principal fuente dietética. El contenido de ácido ferúlico en el grano de trigo es de 0,8 a 2 g/kg de peso seco (Manach et al., 2004).

b) Estilbenos

Los estilbenos tienen una estructura C6-C2-C6 y son fitoalexinas producidas por las plantas en respuesta a enfermedades, lesiones y estrés. Su principal representante es el resveratrol, que se puede presentar como isómeros *cis* y *trans* (Figura II.3), así como en forma de distintos derivados conjugados. La raíz leñosa de *Polygonum cuspidatum* contiene niveles inusualmente altos de *trans*-resveratrol y de su glucósido (piceido), con concentraciones de hasta 3,77 mg/g de peso seco (Del Río et al., 2013). Sin embargo, este tipo de compuestos se encuentran pobremente representados en la dieta humana, siendo sus fuentes más importantes uvas, mostos, vino tinto y cacahuetes (Cassidy et al., 2000). En vino tinto se han descrito contenidos entre 0,3-7 mg de *trans*-resveratrol/L y hasta 15 mg de glucósidos/L (Manach et al., 2004).

c) Lignanos

La estructura básica de los lignanos es (C6-C2)<sub>2</sub>. La fuente dietética más rica de estos compuestos es la linaza, que contiene mayoritariamente secoisolariciresinol (Figura II.3) (hasta 3,7 g/kg de peso seco) y bajas cantidades de matairesinol (Manach et al., 2004). Concentraciones menores se encuentran también en otras semillas oleaginosas (soja, lentejas), salvado de cereales, algas y algunas hortalizas (ajo, espárrago, zanahoria o brócoli) (Cassidy et al.,

2000). En el organismo humano, los lignanos vegetales se metabolizan por la microbiota intestinal a enterolignanos, (enterodiol y enterolactona), a los que se atribuyen los efectos beneficiosos para la salud del consumo de lignanos (Adlercreutz, 2007).

d) Alcoholes fenólicos

Los alcoholes fenólicos (C6-C2) están principalmente representados por el tirosol y el hidroxitirosol (Figura II.3) y compuestos derivados como sus ésteres con ácido elenoico (p.ej., oleuropeína). Las aceitunas y el aceite de oliva son las principales fuentes dietéticas de estos compuestos. En aceitunas negras comerciales se han encontrado concentraciones de hidroxitirosol entre 9,4 y 40,9 mg/kg (García et al., 2018). Contenidos de 40,2 y 3,8 mg/kg de tirosol e hidroxitirosol, respectivamente, se han descrito en aceite de oliva por Cabrini et al. (2001), mientras que Romero & Brenes (2012) determinaron niveles de tirosol+hidroxitirosol de 100 a 400 mg/kg en aceites de oliva virgen extra de origen español y de diferentes variedades.

### **2.1.3 Compuestos fenólicos y salud**

Según datos de la Organización Mundial de la Salud (OMS, 2003), se estima que el 80 % de las enfermedades cardiovasculares (ECV), el 90 % de la diabetes tipo II y un 30 % de los tipos de cáncer se podrían evitar cambiando el estilo de vida, que incluye la dieta. Son considerados factores de riesgo significativos para estas enfermedades: el nivel de colesterol alto, la hipertensión arterial, la obesidad y el consumo insuficiente de frutas y verduras. De este modo, existe un interés creciente en el papel que no sólo los nutrientes sino también determinados componentes no nutritivos de los alimentos, y entre ellos los compuestos fenólicos, pueden tener en la prevención de tales enfermedades (Jaganath y Crozier, 2010).

Existe cada vez más evidencia de que la ingesta moderada, continua y prolongada de compuestos fenólicos puede estar asociada con un menor riesgo de incidencia de enfermedades crónicas como son las ECV, las enfermedades neurodegenerativas, la diabetes tipo II y el cáncer, así como inflamación de bajo grado y síntomas asociados con el envejecimiento (Pinto y Santos, 2017).

Además, debido a la variedad de actividades biológicas atribuidas a los compuestos fenólicos, como son la capacidad antioxidante, antiinflamatoria, estrogénica, antimicrobiana, antiproliferativa o antitumoral, se consideran compuestos prometedores para el desarrollo de nuevos medicamentos (Santos-Buelga y González-Paramás, 2016).

#### 2.1.3.1 Consumo de compuestos fenólicos en la dieta

Una primera estimación del consumo de compuestos fenólicos fue realizada por Kühnau (1976), quien estimó una ingesta diaria promedio de flavonoides de alrededor de 1 g en los Estados Unidos. Más recientemente otros autores han realizado cálculos más precisos utilizando estudios de dieta total combinados con datos sobre contenidos de compuestos fenólicos incluidos en distintas bases de datos que se han ido elaborando en los últimos años. Los valores calculados difieren según la población considerada y la metodología usada para la evaluación, oscilando desde unos cientos de mg hasta casi 2 g por día (Pérez-Jiménez et al., 2011; Vogiatzoglou et al., 2015; Zamora-Ros et al., 2016; Morand et al., 2019).

Una ingesta diaria de compuestos fenólicos de 863 mg en adultos fue estimada en Finlandia por Ovaskainen et al. (2008), constituyendo los derivados de ácidos fenólicos el principal grupo de compuestos consumidos (75 % del total ingerido), seguidos por proantocianidinas (14 %) y antocianos y otros flavonoides (10 %). Pérez-Jiménez et al. (2011) calcularon un consumo medio de compuestos fenólicos de  $1193 \pm 510$  mg/día en la dieta francesa, siendo los ésteres de ácidos hidroxicinámicos y las proantocianidinas los tipos de compuestos fenólicos mejor representados. Ingestas de compuesto fenólicos de  $1756,5 \pm 695,8$  mg/día, con una contribución similar de flavonoides (897 mg/día) y ácidos fenólicos (800 mg/día) fueron obtenidas por Grosso et al. (2014) en adultos polacos. Un estudio más amplio fue realizado por Zamora-Ros et al. (2016) en el marco del estudio EPIC (*European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition*) conducido en 10 países europeos (Dinamarca, Francia, Alemania, Grecia, Italia, Noruega, España, Suecia, Países bajos y Reino Unido), donde se obtuvieron ingestas medias de compuestos fenólicos totales en el intervalo entre 584-744 mg/día para Grecia (consumo más bajo) y 1626-1786

mg/día en Dinamarca (el más elevado). De manera general, los derivados de ácidos fenólicos, sobre todo ácidos clorogénicos, constituían la clase de compuestos fenólicos mejor representados (52,5-56,9 %), excepto en países mediterráneos donde lo eran los flavonoides (49,1-61,7 %), especialmente las proantocianidinas.

#### *2.1.3.2 El rol de los compuestos fenólicos en la salud humana*

En la medicina tradicional se han utilizado ciertas plantas que contienen compuestos fenólicos durante miles de años, por lo que es posible que los efectos beneficiosos de estos fitoquímicos se conocieran mucho antes de que fueran aislados como compuestos activos.

En la década de 1930, Szent-Gyorgyi y colaboradores (Rusznayk y Szent-Gyorgyi, 1936; Benthath et al., 1936 y 1937) propusieron considerar los flavonoides como vitaminas, bajo la denominación de “vitamina P” (por permeabilidad), al observar que preparaciones de zumo de limón y de pimentón ricas en estos compuestos eran capaces de restaurar la permeabilidad y resistencia de los capilares y prevenir la hemorragia asociada a la deficiencia de ácido ascórbico en el hombre, sugiriendo que el escorbuto podría estar causado por una deficiencia de ambas vitaminas, C y P. La denominación de vitamina P fue mantenida durante unos años, aunque finalmente la consideración de los flavonoides como vitaminas fue rechazada al no poder demostrarse su esencialidad (Anónimo, 1950). No obstante, en ese tiempo se publicaron diversos estudios donde se mostraban efectos protectores de estos compuestos en el sistema vascular, como el trabajo de Drezner et al. (1955) donde se describe el efecto de la hesperidina y la vitamina C en el manteniendo de la integridad vascular en pacientes con fragilidad capilar.

En la década de 1990 se renovó el interés por estos compuestos a raíz de las observaciones epidemiológicas de Hertog y colaboradores (Hertog et al., 1993 y 1995), donde se encontraba una asociación inversa entre la ingesta dietética de flavonoides (flavonas y flavonoles) y la incidencia y mortalidad por ECV. Los compuestos fenólicos se clasificaron como antioxidantes generales (Serafini et al., 1994) y originalmente se pensó que esta actividad podía ser usada para explicar su mecanismo de acción global. Sin embargo, la realidad es

mucho más compleja y actualmente se piensa que los efectos biológicos de los compuestos fenólicos implican interacciones bioquímicas específicas a nivel celular y molecular, hipótesis en la que se ha avanzado mucho en las últimas dos décadas. Aunque los compuestos fenólicos químicamente se comportan como antioxidantes, esto no necesariamente se transfiere a la actividad biológica, porque cualquier acción *in vivo* depende tanto de la biodisponibilidad del fitoquímico como del objetivo molecular en las células.

El efecto general de estos compuestos en la reducción del riesgo de enfermedades está respaldado por observaciones epidemiológicas, donde se concluye que los alimentos y bebidas ricos en compuestos fenólicos protegen contra el desarrollo de algunas enfermedades crónicas (Williamson, 2017). En los últimos años se han llevado a cabo numerosos estudios de este tipo, aunque no todos son suficientemente rigurosos, por carecer de controles adecuados, no considerar de forma detallada la composición de los alimentos estudiados o no ser representativa la población considerada. Por lo que es necesario que se realicen más estudios bien controlados y monitorizados y utilizando los marcadores adecuados para establecer el grado de implicación de estos compuestos en la salud (Del Río et al., 2013). Además de esto, la incompleta información disponible sobre la farmacocinética (absorción y metabolismo) podría centrar la observación sobre compuestos que no son realmente biodisponibles (Potì et al., 2019).

Los estudios epidemiológicos deben estar adicionalmente reforzados por ensayos en animales, evaluación de mecanismos en modelos *in vitro* y, sobre todo, estudios de intervención en voluntarios humanos, sanos y en situación de riesgo (Williamson, 2017). En el momento actual, aunque existe ya un notable conocimiento sobre la bioactividad de los compuestos fenólicos, el conocimiento de los mecanismos detrás de su actividad *in vivo* es aún limitado y está en discusión.

### 2.1.3.3 Compuestos fenólicos y salud cardiovascular

A nivel mundial, las ECV son la principal causa de morbilidad y mortalidad, ya que representan el 32 % de todas las causas y el 44 % de las muertes por enfermedades no transmisibles (Potì et al., 2019). Existen numerosas evidencias

de que el consumo de una dieta rica en compuestos fenólicos se asocia a una menor incidencia de ECV, lo que se atribuye a un papel de los mismos en la modulación de factores de riesgo relacionados con esta enfermedad, como son la hipertensión, la disfunción endotelial, el metabolismo lipídico, la intolerancia a la glucosa y la actividad plaquetaria. La protección cardiovascular que ejercen los compuestos fenólicos se ha relacionado, entre otros, con el consumo de bayas, cítricos, café, granada o nueces, y sobre todo con alimentos ricos en flavan-3-oles, como té, vino tinto y cacao (Del Río et al., 2013). Diversos estudios han relacionado el consumo de alimentos ricos en estos fitoquímicos con un descenso en la presión arterial tanto en individuos sanos como en hipertensos (Hertog et al., 1993 y 1995; Buijsse et al., 2006; McCullough et al., 2006; Brüll et al., 2015), así como con una mejora en la vasodilatación dependiente de endotelio, que se asocia con una mayor biodisponibilidad de óxido nítrico (Diebolt et al., 2001; Yang et al., 2004; Balzer et al., 2008; Hooper et al., 2012; Choi et al., 2015). Además, existen ensayos que relacionan el consumo de alimentos que contienen compuestos fenólicos con una mejora en los perfiles de colesterol plasmático, es decir, aumento de colesterol unido a lipoproteínas de alta densidad (HDL) y disminución del colesterol asociado a lipoproteínas de baja densidad (LDL) (Shrime et al., 2011; Argani et al., 2016; Morand et al., 2019).

En España, en el estudio epidemiológico denominado PREDIMED (Prevención con Dieta Mediterránea) se evaluó la relación entre la dieta mediterránea y el riesgo cardiovascular en personas de entre 55 y 80 años con alto riesgo cardiovascular, pero que no padecían enfermedades de esta clase al comienzo del estudio. La dieta mediterránea tradicional se caracteriza por un alto consumo de alimentos ricos en compuestos fenólicos como aceite de oliva, frutas, nueces, verduras y cereales; una ingesta moderada de pescado y aves de corral; una ingesta baja de productos lácteos, carnes rojas, carnes procesadas y dulces, y el consumo moderado de vino, también rico en compuestos fenólicos. Los resultados mostraron que el seguimiento de una dieta mediterránea suplementada con aceite de oliva virgen extra o frutos secos reducía la incidencia de accidentes cardiovasculares graves (infarto de miocardio, accidente cerebrovascular o muerte por enfermedad cardiovascular) en personas con riesgo de padecerlos (Estruch et al., 2013). Sin embargo, es

importante mencionar que algunos resultados del estudio PREDIMED han sido cuestionados por algunas deficiencias en el diseño estadístico en los grupos de ensayo (Calisle, 2017). Aunque algunos aspectos han sido revisados y re-evaluados por los autores, que llegaron a publicar una retracción (Estruch et al., 2018a), las conclusiones generales del estudio PREDIMED se siguen considerando válidas, apoyadas en la nueva información corregida aportada (Estruch et al., 2018b).

#### *2.1.3.4 Compuestos fenólicos y salud neuronal*

Los avances en la medicina y la mejora en la alimentación han conducido en los últimos años a un aumento significativo en la esperanza de vida, especialmente en los países desarrollados. Como consecuencia de esto, el envejecimiento de la población lleva a una mayor incidencia de enfermedades asociadas con la edad y, especialmente, las enfermedades neurodegenerativas (Jaul y Barron, 2017). La neurodegeneración es un trastorno común compartido por varias enfermedades, como la esclerosis lateral amiotrófica, la enfermedad de Huntington, la enfermedad de Alzheimer, la demencia frontotemporal o la enfermedad de Parkinson. Su etiología es multifactorial y aún está lejos de ser plenamente entendida. Entre los diversos factores involucrados se enumeran la neuroinflamación crónica, la senescencia celular, la inestabilidad genómica y la pérdida de proteostasis. Los tratamientos actuales para detener el deterioro cognitivo se limitan a contrarrestar los síntomas de manera transitoria, sin tener en cuenta la patología subyacente. En este escenario, el desarrollo de estrategias alternativas para prevenir o retardar la neurodegeneración es una necesidad urgente. Así, en últimos años, el papel de la dieta como herramienta preventiva para el deterioro cognitivo ha sido un objeto de investigación intensiva (Potì et al., 2019).

En este sentido, muchos estudios epidemiológicos y de intervención sugieren una relación entre el consumo de productos ricos en compuestos fenólicos y una mejora en el rendimiento cognitivo (Bell et al., 2015; Cicero et al., 2018; Haller et al., 2018; Pervin et al., 2018). Los mecanismos que podrían estar relacionados con los beneficios a nivel neurológico de estos compuestos incluyen su capacidad para interactuar con la señalización intracelular neuronal

y glial, para influir en el flujo sanguíneo periférico y cerebrovascular, y para reducir el daño neuronal (Del Río et al., 2013). Sin embargo, no todos los estudios realizados han arrojado resultados positivos en la mejora cognitiva de manera inequívoca (Yang et al., 2016; Radd-Vagenas et al., 2018; Roozbeh et al., 2018).

#### 2.1.3.5 Compuestos fenólicos y cáncer

El cáncer es una de las principales causas de muerte en todo el mundo y su tratamiento principal es la quimioterapia. Sin embargo, debido a los efectos secundarios negativos que puede tener se están buscando alternativas para prevenir y tratar esta familia de enfermedades (Saibabu et al., 2015). En las últimas dos décadas, los efectos anticancerígenos de los compuestos fenólicos se han convertido en un tema importante de estudio, siendo candidatos potenciales para el descubrimiento de fármacos contra el cáncer (Zhou et al., 2016).

Existen muchos estudios *in vitro* y en modelos animales, así como de intervención en humanos con estos fitoquímicos que sugieren su posible actividad anticarcinogénica. Entre las propiedades que se les atribuye se encuentran el proteger los componentes celulares (ADN, proteínas y lípidos) de las lesiones oxidativas, e inhibir la proliferación e inducir la apoptosis de las células cancerígenas (Saibabu et al., 2015). Se ha demostrado que flavonoides, como antocianos, catequinas, flavonoles, flavonas, flavanonas o isoflavonas, pueden disminuir el riesgo de cáncer al inhibir el crecimiento celular en los tumores (Wang, S. et al., 2014). Las observaciones disponibles sugieren efectos beneficiosos de los compuestos fenólicos en la prevención y desarrollo de cáncer de pulmón, estómago, colon, próstata, epitelial, endometrial y de mama (Boullata y Hudson, 2012; Christensen et al., 2012; Zamora-Ros et al., 2013; Guo et al., 2014; Woo et al., 2014; Fujiki et al., 2015; Zhang et al., 2016; Zhou et al., 2016). Sin embargo, existen también estudios epidemiológicos donde no se encuentra relación entre el consumo de productos ricos en compuestos fenólicos y una menor incidencia del desarrollo de diferentes tipos de cáncer (Chen, M. et al., 2014; Petrick et al., 2015; Nimptsch et al., 2016; Wang, Y. et al., 2014).



Por último, es importante señalar que las implicaciones para la salud de los compuestos fenólicos dependen en gran medida de la composición de los alimentos, la cantidad consumida y de su biodisponibilidad. Estos fitoquímicos se modifican durante la absorción en el intestino delgado, a través del metabolismo y la conjugación, y en el intestino grueso, principalmente por acción de la microflora colónica, así como por el metabolismo hepático posterior. Muchos de estos aspectos están determinados por factores genéticos y ambientales, lo que podría trasladarse a efectos diferentes según los individuos (Jaganath y Crozier, 2010; Potì et al., 2019).

#### **2.1.4 Biodisponibilidad y metabolismo de los compuestos fenólicos**

La biodisponibilidad se puede definir como "la tasa y el grado en que un ingrediente activo o una fracción activa es absorbido desde una matriz y llega a estar disponible en el sitio de acción". En base a esto, los parámetros más importantes para que un compuesto fenólico pueda ser efectivo dentro de un sistema biológico son la tasa de absorción y la disponibilidad en el sitio de acción (González-Paramás et al., 2019).

En los alimentos, la mayoría de los compuestos fenólicos se encuentran glicosilados, aunque también se pueden encontrar esterificados o como polímeros. Una vez ingeridos, son reconocidos por el cuerpo humano como xenobióticos, y su biodisponibilidad es relativamente baja en comparación con los micro y macronutrientes. Además, dependiendo de su grado de complejidad estructural, estos compuestos pueden absorberse en el intestino delgado (se ha estimado que por término medio podría ser un 5-10 % de los compuestos fenólicos consumidos) o alcanzar el colon casi sin cambios (Clifford, 2004). En el intestino grueso, la interacción con la microbiota es responsable de una extensa biotransformación de los compuestos fenólicos originales hacia una serie de metabolitos fenólicos de bajo peso molecular (Cardona et al., 2013), que también podrían ser absorbidos y ser adicionalmente conjugados, ya sea en la pared intestinal, el hígado o en tejidos periféricos. Por lo tanto, los compuestos que pueden alcanzar las dianas metabólicas son químicamente y, en muchos casos, funcionalmente distintos de las formas originales, y tales características subyacen a su bioactividad (Kroon et al., 2004).

#### *2.1.4.1 Absorción y metabolismo*

Para que los compuestos fenólicos glicosilados puedan ser absorbidos por el organismo es necesaria una hidrólisis previa para liberar el aglicón. Esta desglicosilación se produce fundamentalmente en el intestino, pero puede comenzar en la cavidad oral, por la actividad de enzimas  $\beta$ -glucosidasas de la saliva o de la microbiota oral (Requena et al., 2010). La hidrólisis de los compuestos fenólicos en el intestino ocurre en intestino delgado o grueso de forma dependiente del tipo de sustituyente de azúcar y también de la complejidad del compuesto. En el intestino delgado, algunos monoglicósidos, como la quercetina-3-O-glucósido, pueden ser hidrolizados en el epitelio intestinal por la enzima lactasa-floricín hidrolasa (LPH), liberando el aglicón, que puede ingresar al enterocito por difusión pasiva debido a su mayor lipofilicidad. Por otro lado, existe controversia acerca de la posibilidad de un transporte activo de algunos glicósidos, como quercetina-4'-O-glucósido, a las células epiteliales por el transportador de glucosa dependiente de sodio (SGLT1) y la posterior hidrólisis de estos en las células por acción de una  $\beta$ -glucosidasa citosólica (CBG) (Day et al., 2003; Németh et al., 2003).

Los flavan-3-oles, en su mayoría, pasan inalterados al intestino grueso donde pueden ser metabolizados por la flora colónica. Sin embargo, existen algunos flavan-3-oles monómeros (8-17 % aproximadamente) que pueden ser absorbidos en los enterocitos del intestino delgado sin hidrólisis previa (Santhakumar et al., 2018). Los compuestos con gran peso molecular, como las proantocianidinas poliméricas no pueden absorberse en el intestino delgado, mientras que las proantocianidinas oligoméricas también es poco probable que puedan absorberse sin una degradación previa a compuestos de menor peso molecular. Por otro lado, los ácidos hidroxicinámicos comúnmente se encuentran esterificados con azúcares, ácidos orgánicos y lípidos, y no existen esterasas en los humanos capaces de romper estos enlaces éster, por lo que el principal sitio para su metabolismo es en el colon por la acción de la microbiota colónica (Marín et al., 2015).

Una vez que los compuestos fenólicos son absorbidos en el intestino delgado interactúan con las enzimas de fase II (catecol-O-metiltransferasas (COMT), uridin-5'-difosfato glucuronosiltransferasas (UGTs) y sulfotransferasas

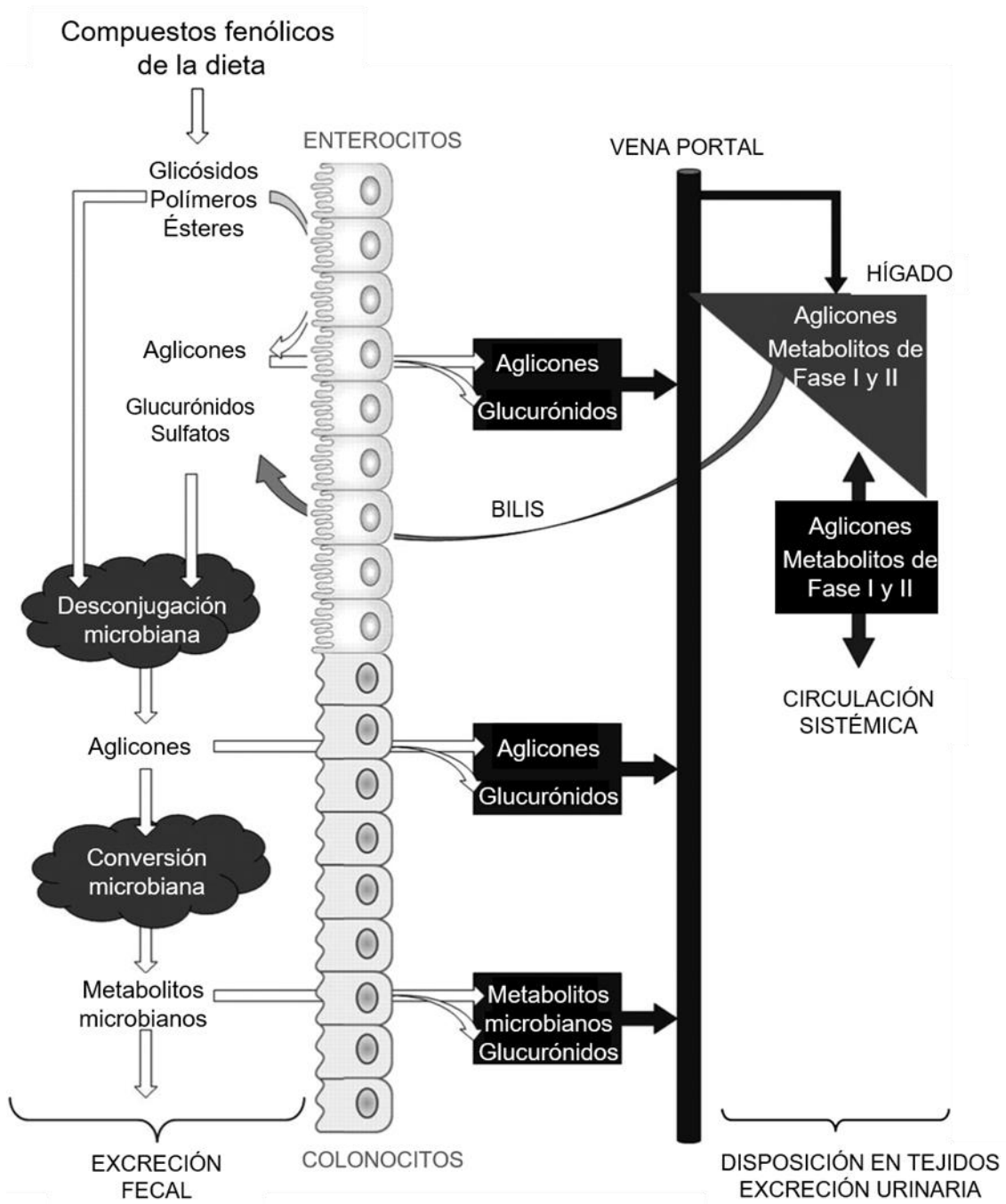
(SULT) ya en el propio enterocito y posteriormente en el hígado y los tejidos periféricos. Como resultado de esta interacción se producen metabolitos conjugados (glucurónidos, sulfatos y derivados metilados) que se encontrarán circulando en el plasma. Excepto en los casos de algunos flavonoides particulares, como ciertas catequinas o isoflavonas, los aglicones no se encuentran circulando como tales en sangre. Se ha sugerido que, si bien la metilación y la glucuronidación se producen tanto en las células intestinales como en el hígado, la sulfatación se produce principalmente en el hígado (Rechner et al. 2002). La conjugación representa un proceso de desintoxicación metabólica común a muchos compuestos xenobióticos, que facilita su eliminación biliar y urinaria mediante un aumento de la solubilidad y un mayor peso molecular (D'Archivio et al., 2010).

Después de las conversiones en el hígado se produce el transporte enterohepático vía biliar y algunos metabolitos pueden volver al intestino delgado, pudiendo posteriormente ser reabsorbidos. Además, algunos metabolitos conjugados, especialmente los derivados glucurónidos, pueden ser bombeados al interior de la luz intestinal mediante transportadores de membrana ABC (*ATP-Binding Cassette*), como las proteínas de resistencia a múltiples fármacos (*Multidrug Resistance Proteins*, MRP) y la proteína de resistencia al cáncer de mama (*Breast Cancer Resistant Protein*, BCRP), para participar en el reciclado local y entérico (González-Paramás et al., 2019).

Los compuestos fenólicos que no son absorbidos en el intestino delgado (estimado en el 90-95 % de los compuestos fenólicos consumidos) y las formas conjugadas que llegan al intestino a través de la bilis, cruzan el tracto intestinal y alcanzan el intestino grueso. En este sitio experimentan una biotransformación por acción de enzimas microbianas, capaces de catalizar una amplia variedad de reacciones, como deshidroxilación, desmetilación, descarboxilación, hidrólisis de los glucurónidos, sulfatos y glicósidos o ruptura de anillos, conduciendo a la formación de diferentes moléculas de bajo peso molecular (Aura, 2008; Stevens y Maie, 2016). Los metabolitos producidos pueden ser absorbidos y, a través de circulación portal, llegar al hígado, donde también se pueden someter a un metabolismo adicional de fase II antes de ser distribuidos por circulación

sistémica a los tejidos periféricos o ser excretados por los riñones (Santhakumar et al., 2018). Un esquema de estos procesos se recoge en la Figura II.4.

Debido a este extenso proceso metabólico, la concentración final de compuestos fenólicos y metabolitos en el plasma humano puede alcanzar niveles de rango nanomolar a micromolar en unas pocas horas para posteriormente casi desaparecer a las 24 h (Kawabata et al., 2019).



**Figura II.4.** Esquema de metabolismos y absorción de los compuestos fenólicos.

Fuente: Modificado de Kemperman et al. (2010).

#### 2.1.4.2 Transformación de los compuestos fenólicos por la microbiota intestinal

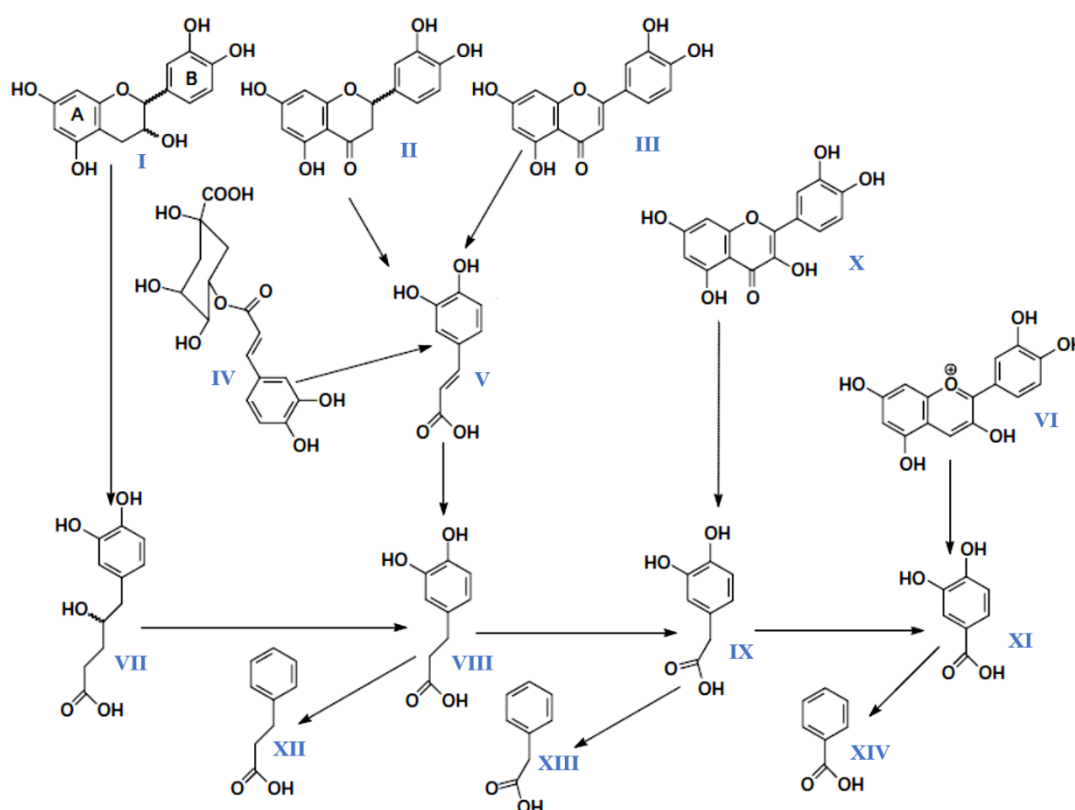
El tracto buco-gastrointestinal humano está colonizado por un amplio espectro de especies bacterianas, que se han asignado a más de 1000 especies y se encuentra dominado por bacterias anaerobias (Williamson y Clifford, 2017). Cada porción de este tracto (boca, esófago, estómago, intestino delgado e intestino grueso) tiene una flora distintiva, pero la mayoría de los organismos se encuentran en el intestino grueso, donde la concentración puede alcanzar  $10^{11}$ - $10^{12}$  bacterias/g, representando alrededor del 35-50 % del contenido total (Williamson y Clifford, 2010). La placa dental contiene alrededor de  $10^{11}$  bacterias/g, y la saliva en torno a  $10^8$ - $10^9$  bacterias/mL (Dueñas et al., 2015). Los tres filos bacterianos más dominantes en el colon son Firmicutes, Bacteroidetes y Actinobacteria, siendo Proteobacteria y Verrucomicrobia generalmente menos abundantes (Williamson y Clifford, 2017). Sin embargo, solo unas pocas especies bacterianas (p.ej., *Escherichia coli*, *Bifidobacterium* sp., *Lactobacillus* sp., *Bacteroides* sp., *Eubacterium* sp.) catalizan el metabolismo de los compuestos fenólicos (Cardona et al., 2013). En la Tabla II.2 se puede observar una relación entre los principales metabolitos microbianos derivados de los compuestos fenólicos y las bacterias involucradas en su transformación.

Las bacterias nativas se adquieren principalmente al nacer y durante el primer año de vida, mientras que las bacterias transitorias se ingieren continuamente a través de los alimentos, las bebidas y el medio ambiente. La composición filogenética de la microbiota intestinal se considera específica y estable en el tiempo para cada individuo, variando mucho entre cada persona (Dueñas et al., 2015). En consecuencia, aparte de las variaciones cuali- y cuantitativas en la ingesta diaria de compuestos fenólicos, las diferencias interindividuales en la composición de la microbiota intestinal pueden llevar a diferencias en la biodisponibilidad y bioeficacia de los compuestos fenólicos y sus metabolitos (Cardona et al., 2013).

**Tabla II.2.** Principales metabolitos derivados de flavonoides y bacterias identificadas involucradas en su transformación. Fuente: Marín et al. (2015). (1) Romo-Vaquero et al. (2015), Li et al. (2016); (2) Peirotén et al., (2019).

<b>Precusores</b>	<b>Principales metabolitos identificados</b>	<b>Bacterias</b>
Flavonoles	Ácidos fenilacéticos Ácidos fenilpropiónicos Ácido protocatéquico	<i>Clostridium orbiscidens</i> <i>Eubacterium oxidoreducens</i> <i>Eubacterium ramulus</i> <i>Enterococcus casseliflavus</i>
Flavanonas	Ácidos fenilpropiónicos Ácidos cinámicos	<i>Clostridium</i> spp. <i>Eubacterium ramulus</i>
Flavan-3-oles	Fenilvalerolactonas Ácidos fenilvaléricos Ácidos fenilacéticos Ácidos fenilpropiónicos Ácidos benzoicos	<i>Clostridium coccoides</i> <i>Bifidobacterium</i> spp.
Antocianos	Ácido protocatéquico Ácido siríngico Ácido vanílico Ácido propiónico Catecol Pirogalol	<i>Lactobacillus plantarum</i> <i>Lactobacillus casei</i> <i>Lactobacillus acidophilus</i> <i>Bifidobacterium lactis</i>
Flavonas	Ácidos fenilpropiónicos Ácidos cinámicos	<i>Clostridium orbiscidens</i> <i>Enterococcus avium</i>
Isoflavonas	(S)-Equol O-Demetilangolensina 6'-Hidroxi-O-desmetilangolensina Daidzeina Genisteina	<i>Bacteroides ovatus</i> <i>Streptococcus intermedius</i> <i>Ruminococcus productus</i> <i>Eggerthella</i> sp. <i>Enterococcus faecium</i> <i>Lactobacillus mucosae</i> <i>Finnegoldia magna</i> <i>Clostridium</i> spp.
Ácidos hidroxicinámicos	Ácidos fenilpropiónicos Ácidos benzoicos Vainillina	<i>Escherichia coli</i> <i>Bifidobacterium lactis</i> <i>Lactobacillus gasseri</i>
Ácido elágico y elagitaninos (1)	Urolitinas	<i>Gordonibacter</i> spp. <i>Akkermansia muciniphila</i>
Lignanós (2)	Enterodiól Enterolactona	<i>Ruminococcus</i> spp. <i>Eggerthella lenta</i> <i>Bifidobacterium</i> spp. <i>Lactobacillus</i> spp.

Los catabolitos predominantes generados por la microbiota a partir de los compuestos fenólicos son los ácidos aromáticos y fenólicos con hasta tres hidroxilos aromáticos, o sus análogos mono o di-metoxilados, que poseen una cadena lateral de uno a cinco carbonos que podrían tener un hidroxilo alifático (Williamson y Clifford, 2017). Los flavonoles se degradan principalmente en ácidos fenilacéticos, las flavonas y flavanonas en ácidos cinámicos y fenilpropiónicos, y los flavan-3-oles producen principalmente fenilvalerolactonas y ácidos fenilpropiónicos; todos estos ácidos se metabolizan aún más a ácidos benzoicos y derivados (Manach et al., 2004). Asimismo, los antocianos se degradan principalmente a derivados del ácido benzoico (Aura, 2008) (Figura II.5).



**Figura II.5.** Estructuras de compuestos fenólicos y de sus catabolitos microbianos representativos. Se muestran las estructuras típicas para los flavan-3-oles (catequinas) (I); flavanonas (II); flavonas (III); ácidos clorogénicos (conjugados cinámicos) (IV); ácidos cinámicos (C6–C3) (V); antocianos (VI); ácidos fenilvaléricos (C6–C5- $\gamma$ -OH) (VII); ácidos fenilpropiónicos (C6–C3) (VIII, XII); ácidos fenilacéticos (C6–C2) (IX, XIII); flavonoles (X); ácidos benzoicos (XI, XIV). Fuente: Modificado de Williamson y Clifford (2010).

En estudios en seres humanos *in vivo* y de fermentación *in vitro* con microbiota intestinal se ha visto que al menos algunos de estos ácidos fenólicos C6-C1 y posiblemente C6-C2 pueden ser adicionalmente descarboxilados produciendo los correspondientes fenoles (C6) o metilfenoles (C6-C1), respectivamente. Existen, además, algunos catabolitos como, por ejemplo, los ácidos mandélico y fenilhidracrílico, cuyo origen sigue siendo incierto (Williamson y Clifford, 2017).

Para este trabajo nos hemos centrado en el estudio de 6 metabolitos fenólicos microbianos: ácido protocatéquico (ácido 3,4-dihidroxibenzoico, **PCA**), ácido vanílico (ácido 3-metoxi-4-hidroxibenzoico, **VA**), ácido 3,4-dihidroxifenilacético (**DHPAA**), ácido 3-(4-hidroxifenil)-propiónico (**3-4HPA**), ácido dihidrocafeico (ácido 3-(3,4-dihidroxifenil)-propiónico, **DHCA**) y ácido cafeico (ácido 3,4-dihidroxicinámico, **CA**). Estos metabolitos se encuentran ampliamente disponibles después del consumo de compuestos fenólicos abundantes en la dieta.

Como se mencionó anteriormente, una vez que los flavonoides se han metabolizado en sus aglicones, se degradan ampliamente por la acción de la microbiota colónica, generando compuestos más simples derivados del metabolismo de los anillos A y B, después de la escisión del anillo C. Los compuestos aromáticos hidroxilados se forman a partir del anillo A y los ácidos fenólicos del anillo B. El patrón de hidroxilación de los anillos A y B afecta, por lo tanto, al tipo de compuestos fenólicos producidos (Aura, 2008).

En el caso de los **flavonoles**, la escisión del anillo C puede tener lugar en diferentes posiciones (entre las posiciones C1 y C2, entre C3 y C4, o entre C4 y C10) dando lugar a un alto número de compuestos fenólicos simples. Después de la fisión del anillo C, se produce la deshidroxilación en los dos anillos fenólicos libres restantes. En el caso de la quercetina, por ejemplo, como resultado de todo este proceso se obtienen dos metabolitos principales que son **DHPAA** y **PCA**.

La degradación de las **flavanonas** por la microbiota colónica es similar a la observada en los flavonoles, siendo la diferencia principal la escisión del anillo C sólo entre las posiciones C1 y C2 o entre C4 y C10 (Marín et al., 2015). Las flavanonas se degradan principalmente a derivados del ácido fenilpropiónico,



como es el **3-4HPA** (Aura, 2008). En el caso de las **flavonas**, después de la fisión del anillo C, son degradadas principalmente a **DHCA**, **3-4HPA**, ácido 3-(3-hidroxifenil)-propiónico y ácido 4-hidroxicinámico (Marín et al., 2015).

En lo que respecta a los **flavan-3-oles**, los aglicones sufren la apertura del anillo C seguida de diferentes reacciones como la lactonización, descarboxilación, deshidroxilación u oxidación. Los ácidos fenilvaléricos y las fenil- $\gamma$ -valerolactonas resultantes se han descrito como metabolitos microbianos exclusivos de flavan-3-oles. Estos ácidos son posteriormente transformados por la pérdida sucesiva de átomos de carbono para dar lugar a diferentes **ácidos fenilacéticos, fenilpropiónicos y benzoicos**, y en menor extensión a los ácidos hipúrico, **VA** y homovanílico mediante conjugación adicional (González-Paramás et al., 2019).

Los aglicones de los antocianos se descomponen por escisión del anillo C en la posición C3, metabolizándose en diferentes ácidos fenólicos y constituyentes aldehídicos (Santhakumar et al., 2018). Algunos de estos son **PCA**, ácido siríngico (ácido 3,4-dimetoxibenzoico), **VA** y ácido 4-hidroxibenzoico (Marín et al., 2015).

Aunque la máxima absorción de los ácidos fenólicos suceda a nivel del intestino delgado (Santhakumar et al., 2018), se ha observado que alrededor del 70 % de ácidos clorogénicos (cafeoilquínicos) consumidos en la dieta llega al colon para ser degradados por la microbiota, ya que no existen esterasas humanas capaces de hidrolizar estos ácidos para liberar al **CA** (Manach et al., 2004; Del Río et al., 2013). Otro metabolito microbiano principal del ácido clorogénico es el **DHCA** (Del Río et al., 2013). Por otro lado, los metabolitos más frecuentes del ácido ferúlico producidos por la microbiota colónica son vainillina y **3-4HPA** (Marín et al., 2015).

#### *2.1.4.3 Biodisponibilidad de los metabolitos fenólicos microbianos*

Como se mencionó anteriormente, la mayoría de los compuestos fenólicos que se ingieren en la dieta son poco absorbidos y en gran parte biotransformados en el cuerpo humano, ya sea por las enzimas de las fases I y II del metabolismo o por la microbiota intestinal. Por lo que estos metabolitos

representan las principales formas circulantes de compuestos fenólicos de la dieta en el organismo y pueden ser los responsables de la bioactividad asociada al consumo de los compuestos originales. Estudios recientes en humanos indican que las concentraciones plasmáticas y las excreciones urinarias de los metabolitos microbianos pueden exceder las de los compuestos originales (Kemperman et al., 2010).

a) Ácido protocatéquico (PCA)

El ácido protocatéquico es uno de los metabolitos microbianos más abundantes en el intestino grueso, siendo producto principalmente del metabolismo de distintos flavonoides, como antocianos, flavonoles o procianidinas. Este metabolito y sus conjugados de fase II se han detectado en concentraciones relevantes en plasma, orina y heces, después del consumo de dietas ricas en compuestos fenólicos (Olthoff et al., 2003; Vitaglione et al., 2007; Urpi-Sarda et al., 2009; Koli et al., 2010; Czank et al., 2013; De Ferrars et al., 2014a; De Ferrars et al., 2014b; Pimpão et al., 2014; McKay et al., 2015; Schön et al., 2018).

Vitaglione et al. (2007) encontraron que el PCA constituía el principal metabolito fenólico en plasma después de una ingesta aguda de glucósidos de cianidina por personas sanas, representando el 44 % del total de metabolitos detectados. Asimismo, Koli et al. (2010) investigaron la biodisponibilidad de los compuestos fenólicos de diferentes bayas (837 mg de compuestos fenólicos al día, principalmente antocianos) consumidas durante 8 semanas por personas sanas, y describieron un aumento significativo en los niveles de PCA plasmático para el grupo que había consumido bayas en comparación del grupo control. Czank et al. (2013) encontraron que los metabolitos más abundantes en orina después del consumo de 500 mg de cianidina-3-O-glucósido marcada con  $^{13}\text{C}$  en humanos sanos eran los conjugados de fase II (sulfatos, glucurónidos y metilados) de PCA. El ácido protocatéquico alcanzaba concentraciones máximas de  $337 \pm 117$  nM en orina 1-2 h después de la ingesta de los antocianos. El ácido protocatéquico y sus sulfatos también se detectaban en heces con recuperaciones máximas de  $360,9 \pm 278,1$   $\mu\text{g}$  (PCA),  $30,0 \pm 27,7$   $\mu\text{g}$  (PCA-3-sulfato) y  $23,0 \pm 18,1$   $\mu\text{g}$  (PCA-4-sulfato) a las 6-24 h posteriores a la ingesta de

500 mg de antocianos (De Ferrars et al., 2014b). De Ferrars et al. (2014a) encontraron que los sulfatos del PCA constituían el grupo principal de metabolitos fenólicos en plasma, representando el 28,31 % del total de metabolitos detectados 3 h después de una ingesta aguda de 500 mg de extracto de saúco en mujeres postmenopáusicas; mientras que el PCA constituía el 2 %. Las concentraciones de sulfatos de PCA determinadas en plasma fueron de 358 nM a las 3 h y en orina de  $2014 \pm 1765$  nM/mM de creatinina a las 2-3 h posteriores a la ingesta.

b) Ácido vanílico (VA)

El VA se ha encontrado en niveles significativos en plasma, orina y heces, después del consumo de dietas ricas en antocianos (Koli et al., 2010; Czank et al., 2013; De Ferrars et al., 2014a,b; Pimpão et al., 2014; McKay et al., 2015). De Ferrars et al. (2014a) describieron que el ácido vanílico se encontraba entre los metabolitos fenólicos más abundantes en orina detectados 3 h después de una ingesta aguda de 500 mg de extracto de saúco en mujeres postmenopáusicas, con una concentración de  $4345 \pm 3205$  nM/mM de creatinina, representando el 12,88 % del total de metabolitos. En este mismo estudio se encontró una concentración máxima de VA en plasma de 62 nM (7,03 % del total de metabolitos) a las 2 h. Estos mismos autores (De Ferrars et al., 2014b) detectaron una concentración máxima de VA de  $1845 \pm 838$  nM en plasma, con un  $t_{max}$  de  $12,5 \pm 11,5$  h posterior a la ingesta de 500 mg de antocianos. Asimismo, se detectó en orina con una concentración de  $3412 \pm 312$  nM (1-2 h) y en heces con una recuperación máxima de  $54,7 \pm 1,6$  µg a las 6-24 h.

McKay et al. (2015) también encontraron que entre los metabolitos más abundantes en plasma después de la ingesta aguda de 188,5 mg de antocianos y flavonoles presentes en una bebida de arándanos, se encontraba el VA con una concentración de  $1997,9 \pm 360,9$  µM en plasma a las  $0,7 \pm 0,3$  h. El ácido vanílico también ha sido identificado entre los principales metabolitos en orina después de una dieta rica en flavan-3-oles, principalmente de proantocianidinas (Rios et al., 2003; Urpi-Sarda et al., 2009). Urpi-Sarda et al. (2009) determinaron niveles de VA de  $6,78 \pm 3,56$  µmol/mg de creatinina en orina de 24 h después del consumo agudo de cacao (40 g).

c) Ácido 3,4-dihidroxifenilacético (DHPAA)

Diferentes autores han descrito la presencia del DHPAA en concentraciones relevantes en plasma, orina y heces después del consumo de dietas ricas en compuestos fenólicos (Olthoff et al., 2003; Rios et al., 2003; Jaganath et al., 2006; Urpi-Sarda et al., 2009; De Ferrars et al., 2014a,b; McKay et al., 2015; Feliciano et al., 2017, Sasot et al., 2017).

De Ferrars et al. (2014a,b), identificaron este compuesto entre los metabolitos fenólicos presentes en orina y en heces tras una ingesta aguda de antocianos. Rios et al. (2003) describieron un aumento significativo en la excreción urinaria de DHPAA ( $38,8 \pm 12,3$  nmol/mg de creatinina) en humanos sanos durante las 24 h posteriores al consumo agudo de chocolate rico en flavan-3-oles. Similarmente, Urpi-Sarda et al. (2009) encontraron un incremento en los niveles de DHPAA en orina después de un consumo agudo de cacao en polvo en voluntarios sanos.

El ácido 3,4-dihidroxifenilacético ha sido descrito como uno de los metabolitos fenólicos microbianos más abundante de los flavonoles. Olthoff et al. (2003) detectaron un incremento significativo en los niveles de este metabolito ( $52 \pm 6$   $\mu$ mol, 0-24 h) en la orina de personas sanas después de la ingesta de quercetin-3-rutinósido (660  $\mu$ mol/día) respecto al grupo placebo. Jaganath et al. (2006) describieron que la cantidad total de ácidos fenilacéticos, entre ellos el DHPAA, excretados por voluntarios sanos (39,4 mmol) correspondía al 22 % de la ingesta de quercetin-3-rutinósido (176 mmol presente en 300 ml de zumo de tomate).

d) Ácido 3-(4-hidroxifenil)-propiónico (3-4HPA)

El 3-4HPA ha sido identificado en orina y plasma tras el consumo de dietas ricas en distintos compuestos fenólicos, como antocianos, flavonoles, flavan-3-oles y proantocianidinas (Rios et al., 2003; Feliciano et al., 2017; Pereira-Caro et al., 2017; Sasot et al., 2017). Pereira-Caro et al. (2017) investigaron los metabolitos fenólicos presentes en la orina después de una ingesta aguda de teaflavina (1 g, 1014  $\mu$ mol) en personas sanas y encontraron que el principal producto urinario detectado era el 3-4HPA, con una recolección total de  $166 \pm 91$   $\mu$ mol de 0-30 h posterior a la ingesta. Además, el 3-4HPA ha sido identificado

como el metabolito fenólico más abundante en plasma tras el consumo agudo de un zumo de arándanos que contenía 409 mg de compuestos fenólicos, presentando una concentración máxima de  $312,629 \pm 174,539 \mu\text{M}$  con un  $t_{\text{max}}$  de  $10,0 \pm 2,8$  h (Feliciano et al., 2017).

e) Ácido dihidrocafeico (DHCA)

El DHCA es uno de los metabolitos microbianos más importantes de los ácidos clorogénicos, alcanzando concentraciones máximas en plasma 5–10 h después de la ingesta de estos ácidos (Renouf et al., 2010, 2014; Stalmach et al., 2009). Este metabolito tiene una vida media larga en el organismo, ya que se ha encontrado en la orina 48 h después del consumo de una dosis única de café seguido de una dieta posterior sin compuestos fenólicos (Duarte y Farah, 2011).

El DHCA también ha sido identificado en orina de voluntarios después de la ingesta de una dieta rica en antocianos y proantocianidinas (Rios et al., 2003; Pimpão et al., 2014; Sasot et al., 2017). Olthoff et al. (2003) encontraron un aumento significativo en los niveles de DHCA en la orina de voluntarios sanos después de la ingesta de suplementos ricos en ácidos clorogénicos (2 g, 5,5 mmol/d) y extractos secos de té negro (4 g, 4,3 mmol de compuestos fenólicos al día) durante 7 días, con una recolección total de  $97 \pm 16 \mu\text{mol}$  y  $5 \pm 1 \mu\text{mol}$  de compuestos fenólicos en 24 h después del consumo de los ácidos clorogénicos y el extracto de té, respectivamente.

f) Ácido cafeico (CA)

El ácido cafeico puede ser encontrado en la naturaleza de forma glicosilada o esterificado con ácidos quínicos o tartáricos. Aunque, como ácido se absorbe fácilmente en el intestino delgado, su esterificación, como en el ácido clorogénico, disminuye su absorción y aumenta las cantidades que llegan al colon para su transformación por la microbiota (Gonthier et al., 2006).

Olthoff et al. (2003) encontraron un incremento significativo de CA ( $56 \pm 8 \mu\text{mol}/24$  h) en orina en personas sanas después de la ingesta de suplementos ricos en ácidos clorogénicos (2 g, 5,5 mmol/día) durante una semana. El CA ha sido también detectado en plasma, orina y heces después del consumo de dietas

ricas en antocianos (Koli et al., 2010; De Ferrars et al., 2014a,b; Pimpão et al., 2014; McKay et al., 2015). McKay et al. (2015) encontraron concentraciones máximas de CA de  $5,1 \pm 3,2$  mM en plasma y de  $0,72 \pm 1,11$  mmol/mg de creatinina en orina de voluntarios sanos, a las  $8,2 \pm 1,5$  h y a las  $4,8 \pm 1,5$  h, respectivamente, después de la ingesta aguda de 188,5 mg de antocianos y flavonoles presentes en una bebida de arándanos. De Ferrars et al. (2014b) también detectaron este metabolito en heces con recuperaciones máximas de  $354,6 \pm 125,0$  µg a las 24-48 h posterior a la ingesta de 500 mg de consumo de antocianos. Sasot et al. (2017) identificaron la presencia de CA en orina después de la ingesta de una bebida de orujo de uva rica en antocianos, flavonoles y flavan-3-oles. Asimismo, Urpi et al. (2009) encontraron un aumento significativo de metabolitos fenólicos en orina después de 24 h del consumo agudo de cacao (40 g), incluyendo el CA con una concentración de  $2,16 \pm 0,72$  µmol/mg de creatinina.

#### 2.1.4.4 Modulación de la microbiota intestinal por los compuestos fenólicos de la dieta

El intestino es un órgano del sistema inmunitario, en el cual se concentran más de la mitad de todas las células, incluyendo la microbiota, de este sistema en el organismo. De este modo, la respuesta inmune en el intestino influye sobre la patogenia de trastornos relacionados con la alimentación, como la obesidad, la diabetes, las alergias alimentarias o la enfermedad inflamatoria intestinal. En la actualidad se reconoce que los cambios en la microbiota intestinal están relacionados no solo con la etiología de enfermedades digestivas, sino también de patologías como diabetes, aterosclerosis, enfermedades neuropsiquiátricas y otras enfermedades sistémicas (Kawabata et al., 2019).

Los compuestos fenólicos de la dieta no sólo son transformados por la microbiota intestinal, sino que tanto ellos como sus metabolitos pueden actuar sobre la flora microbiana, afectando a la ecología intestinal (Cardona et al., 2013). En distintos estudios *in vitro* e *in vivo* se ha observado que los compuestos fenólicos o sus catabolitos son capaces de aumentar la proporción de bifidobacterias y eubacterias sin inhibir las bacterias ácido-lácticas. En animales de experimentación se ha encontrado que distintas sustancias fenólicas son

capaces de disminuir la relación Firmicutes/Bacteroidetes (Etxeberria et al., 2015; Jin et al., 2018), lo que se ha relacionado con menores índices de obesidad en humanos (Cox y Blaser, 2013). Se han descrito también efectos prebióticos para distintos compuestos fenólicos, haciendo que aumente la abundancia de especies bacterianas beneficiosas, como *Bifidobacterium* y *Lactobacillus* spp. (Hervert-Hernández et al., 2009; Pozuelo et al., 2012; Cardona et al., 2013), y reduciendo los niveles de patógenos como *Clostridium perfringens*, *Clostridium difficile*, *Salmonella Typhimurium* o *Listeria monocytogenes* (Okubo et al., 1992; Puupponen-Pimiä et al., 2005; Lee et al., 2006). Todas estas modificaciones pueden, además, tener influencia sobre la biodisponibilidad y metabolismo de los compuestos fenólicos, provocando cambios en el perfil de metabolitos producidos, lo que junto con las modificaciones en la funcionalidad de la microbiota tendría efectos subsecuentes en la salud del huésped (Tomás-Barberán et al., 2016; Cueva et al., 2017).

Actualmente se considera que parte de los efectos beneficiosos de los compuestos fenólicos podrían estar relacionados con su capacidad para actuar como prebióticos.

### 2.1.5 Actividad antioxidante

Durante el metabolismo normal se forman constantemente especies reactivas de oxígeno (ROS) y nitrógeno (RNS), como los radicales hidroxilo ( $\text{OH}^{\bullet}$ ), superóxido ( $\text{O}_2^{\bullet-}$ ), óxido nítrico ( $\text{NO}^{\bullet}$ ), dióxido de nitrógeno ( $\text{NO}_2^{\bullet}$ ), peroxilo ( $\text{ROO}^{\bullet}$ ) y los radicales peroxilo lipídico (LOO). En década de 1950, Harman propuso que los organismos envejecen como consecuencia de la acumulación del daño oxidativo proveniente de las especies reactivas del oxígeno (Harman, 1956), y en el año de 1985, Sies formuló la "teoría del estrés oxidativo", según la cual el origen de las principales enfermedades degenerativas podría explicarse por un desequilibrio en el balance dinámico entre prooxidantes y antioxidantes (Sies, 1985). Desde entonces se asumió que los antioxidantes podrían ayudar a contrarrestar este daño oxidativo, contribuyendo a la prevención de las enfermedades relacionadas con la edad. Un antioxidante se puede definir como "cualquier sustancia que retrasa, previene o elimina el daño oxidativo en una molécula diana" (Halliwell y Gutteridge, 1998). De este modo, durante años la

mayoría de los efectos beneficiosos para la salud de los compuestos fenólicos se atribuyeron a sus capacidades antioxidantes y quelantes, ampliamente demostradas en estudios *in vitro*.

La capacidad antioxidante de los compuestos fenólicos se ha asociado a su capacidad reductora y captadora de la mayoría de especies oxidantes, como ROS y RNS, a través de mecanismos que implican la transferencia de un átomo de H o de un solo electrón a la estabilización radical, así como a su actividad quelante de metales, que pueden actuar como catalizadores en las reacciones de oxidación.

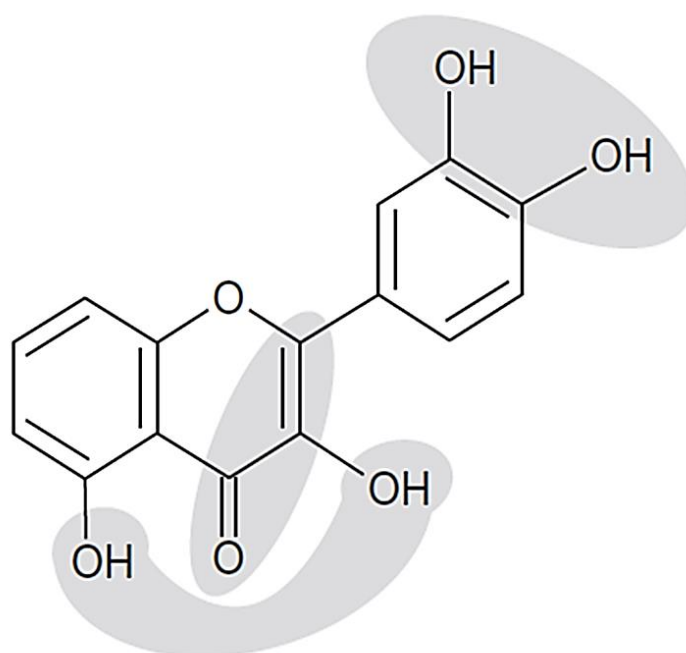
#### 2.1.5.1 Captación de ROS

Los compuestos fenólicos son capaces de captar radicales libres directamente mediante la donación de átomos de hidrógeno, una capacidad que está determinada principalmente por los grupos hidroxilo en su estructura y la naturaleza de otros sustituyentes en el anillo aromático. Una buena actividad de captación de radicales libres depende de las siguientes características: el número y la posición de los grupos OH unidos al anillo aromático; la estructura plana/no plana de los compuestos fenólicos, que permite la conjugación y la deslocalización electrónica, así como los efectos de resonancia; y el número y la posición de los grupos funcionales adicionales, tales como cadenas de hidrocarburos de alquilo, cadenas de alquilo que contienen dobles enlaces carbono-carbono y grupos carbonilo C=O (Losada-Barreiro y Bravo-Díaz, 2017).

En general, los compuestos fenólicos muestran mayor potencial antioxidante cuando presentan mayor número de sustituyentes hidroxilo, aunque, como se mencionó anteriormente, la posición que ocupen dichos grupos dentro de la molécula también es determinante. La presencia de un grupo catecol, en el anillo B para los flavonoides, es el determinante más importante para la eliminación de ROS, debido a su capacidad para donar hidrógeno, dando lugar a un radical derivado relativamente estable (radical aroxilo). Otros criterios estructurales para la actividad de captación de radicales óptima en los flavonoides son la presencia de un doble enlace en C2-C3, conjugado con un sustituyente 4-oxo (C=O en posición C4) en el anillo C y de los grupos hidroxilos en posiciones 3 y 5 (Figura II.6), ya que proporcionan una amplia deslocalización



de electrones sobre el sistema de tres anillos y confiere mayor estabilidad al radical producido (Bors et al., 1990). Sin embargo, algunos autores han cuestionado la estabilidad de los radicales aroxilo formados y han descrito su conversión en radicales secundarios más reactivos, como quinonas o semiquinonas, que pueden dar lugar a efectos prooxidantes o potencialmente citotóxicos (Halliwell, 2008). Por ejemplo, se ha demostrado que la quercetina forma un radical *o*-semiquinona que puede producir *o*-quinonas, así como reaccionar con O<sub>2</sub> para formar un superóxido (Metodiewa et al., 1999).



**Figura II.6.** Requisitos estructurales asociados con la actividad antioxidante los compuestos fenólicos. Fuente: Modificado de Fraga et al. (2010).

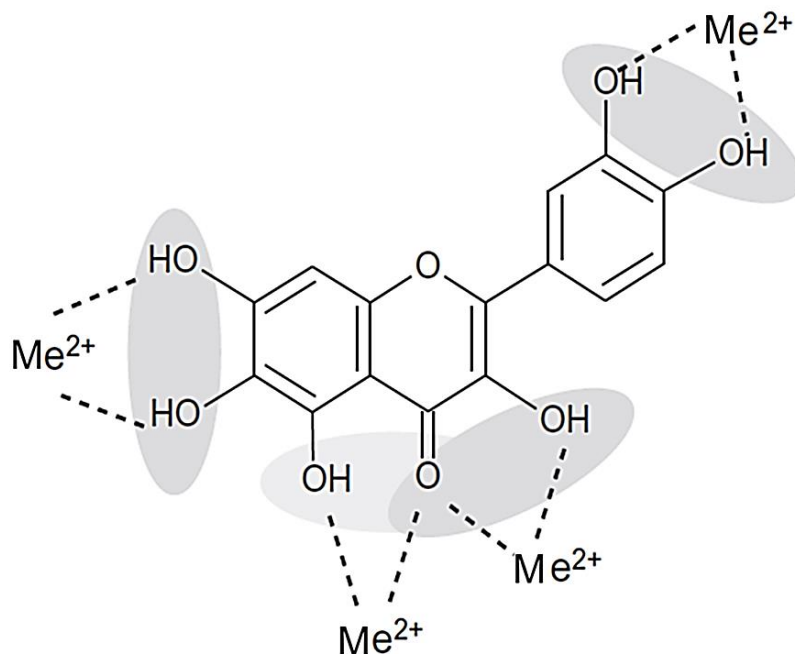
Se ha indicado que la polimerización de los flavonoides, como ocurre en los taninos condensados, aumenta aún más la capacidad antioxidante debido al mayor número de grupos hidroxilo, mientras que la sustitución de los hidroxilos (p.ej., glicosilación o metilación) generalmente disminuye el potencial antioxidante en comparación con las moléculas originales (Heim et al., 2002; Dueñas et al., 2010).

Como se ha mencionado, estructuralmente los ácidos fenólicos son fenoles que poseen un resto de ácido carboxílico que se puede unir directamente

al anillo aromático o a un sustituyente alquilo. Las variaciones en la posición y la naturaleza de los sustituyentes en estos esqueletos básicos influyen sobre el potencial antioxidante. Entre los antioxidantes más potentes y comunes se han citado los ácidos protocatéquico, vanílico y gálico, dentro de los ácidos benzoicos, y los ácidos *p*-cumárico, cafeico, ferúlico y sinápico, entre los hidroxicinámicos (Losada-Barreiro y Bravo-Díaz, 2017).

#### 2.1.5.2 Actividad quelante de metales

Otro mecanismo que puede contribuir a la actividad antioxidante de los compuestos fenólicos es su capacidad para quelar iones metálicos activos redox, como hierro, cobalto, manganeso o cobre, evitando así las reacciones catalizadas por estos iones que llevan a la formación de especies oxidantes que pueden generar un daño oxidativo a diferentes niveles celulares. El  $\text{Fe}^{2+}$  cataliza, en presencia de peróxido de hidrógeno, la formación del radical hidroxilo  $\text{OH}^{\bullet}$  por la reacción de Fenton; mientras que la reacción de  $\text{Cu}^+$  con  $\text{H}_2\text{O}_2$  conduce a la formación de los radicales  $\text{OH}^{\bullet}$  y  $\text{O}_2^{\bullet-}$  (Cherrak et al., 2016). Los compuestos fenólicos presentan valores de  $\text{pK}_a$  entre 6-9, por lo que *in vivo*, a pH fisiológico, se encuentran parcialmente desprotonados (Perron y Brumaghim, 2009). Así, estos compuestos pueden formar complejos metálicos estables a través de los grupos OH y el resto carbonilo presentes, eliminando un factor causal para el desarrollo de radicales libres (Leopoldini et al., 2011). Los antioxidantes que contienen grupos catecol o galol pueden formar complejos con metales, pero no aquellos con un solo grupo OH en su estructura (p.ej., ácidos vanílico, siríngico o ferúlico) (Losada-Barreiro y Bravo-Díaz, 2017). En el caso de los flavonoides, los complejos quelantes con cationes divalentes pueden formarse entre los grupos 3 o 5-OH y 4-oxo, o entre el 6 y 7-OH en el anillo A o 3'- y 4'-OH en el anillo B (Figura II.7) (Cheng y Breen, 2000; Pietta, 2000); este proceso no necesariamente hace que el compuesto fenólico quede inactivo en cuanto a su capacidad antioxidante, ya que el complejo puede retener la actividad de captación de ROS (Arora et al., 1998).



**Figura II.7.** Requisitos estructurales asociados con la actividad quelante de los compuestos fenólicos. Fuente: Modificado de Fraga et al. (2010).

#### 2.1.5.3 Capacidad para modular enzimas relacionadas con mecanismos de actividad antioxidante

Otra función importante de los compuestos fenólicos es la activación de defensas endógenas o la inhibición de enzimas responsables de la producción de superóxido, como las oxidasas (Procházková et al., 2011).

Los compuestos fenólicos se han relacionado con una mayor expresión y actividad de enzimas antioxidantes endógenas, como glutatión peroxidasa (GPx), catalasa (CAT) o superóxido dismutasa (SOD) (Panchatcharam et al., 2006; Shih et al., 2007; González-Manzano et al., 2012; Szwajgier et al., 2017). La SOD convierte el superóxido en  $H_2O_2$ , y la CAT o las peroxidases (p.ej., GPx o peroxirredoxinas) posteriormente convierten  $H_2O_2$  en agua (Lü et al., 2010). Los compuestos fenólicos también pueden inducir enzimas detoxificantes de fase II (p.ej., NAD(P)H-quinona oxidoreductasa 1 (NQO1), glutatión-S-transferasa (GST) y UDP-glucuronosil transferasa), que son la principal línea de defensa enzimática contra tóxicos electrofílicos, que son activadas a través de la ruta Keap-Nrf2 (Shih et al., 2007). Se sabe que la mayoría de los genes de fase II generalmente contienen elementos reguladores, denominados elementos de

respuesta antioxidante (ARE), o elementos de respuesta a electrófilos (EpRE). La inducción de estos elementos puede tener su origen en la propia toxicidad de los compuestos fenólicos en el organismo. Como se ha mencionado anteriormente, los compuestos fenólicos pueden formar quinonas potencialmente tóxicas, que son, a su vez, sustratos de enzimas antioxidantes, de manera que podrían activar estas enzimas para su propia desintoxicación y, así, inducir un refuerzo general de las defensas del organismo contra xenobióticos potencialmente tóxicos (González-Paramás et al., 2019).

Los compuestos fenólicos también pueden disminuir las concentraciones celulares de radicales libres mediante la inhibición de la expresión o de la actividad de enzimas generadoras de los mismos, como la nicotidamida adenin dinucleótido fosfato (NADPH) oxidasa o la xantina oxidasa (XO). La NADPH oxidasa es un grupo de enzimas asociado a la membrana plasmática que cataliza la producción de  $O_2^{\cdot-}$  en neutrófilos activados. La xantina oxidasa es una enzima involucrada en la formación de ácido úrico en el cuerpo, que cataliza la oxidación de hipoxantina y xantina a ácido úrico, dando lugar a la producción de  $O_2^{\cdot-}$  y  $H_2O_2$  y aumentando, así, el nivel de oxidación en el organismo (Lü et al., 2010).

La interferencia de los compuestos fenólicos con la actividad de la enzima óxido nítrico sintasa (NOS) es otro mecanismo potencial para disminuir el daño oxidativo celular. El  $NO^{\cdot}$ , producido por la oxidación de L-arginina catalizada por la NOS, interactúa con los radicales libres, especialmente el  $O_2^{\cdot-}$ , produciendo peroxinitritos. Aunque aún no se comprende claramente cómo los compuestos fenólicos inhiben la inducción de la producción de NOS y  $NO^{\cdot}$ , parece que éstos tendrían la capacidad de eliminar directamente las moléculas de  $NO^{\cdot}$  y de peroxinitrito una vez producidas. Además, los compuestos fenólicos podrían impedir la reacción de los radicales libres con el  $NO^{\cdot}$  gracias a su capacidad captadora de radicales libres, lo que resulta en un menor daño celular (Hertzog y Tica, 2012).

#### *2.1.5.4 Interacción con otros antioxidantes*

Se ha propuesto la interacción de los compuestos fenólicos con el  $\alpha$ -tocoferol ( $\alpha$ -T), un importante antioxidante liposoluble en sangre, tejidos,

membranas celulares y LDL, que tiene capacidad de captar especies reactivas formando radicales tocoferoxilos ( $\alpha\text{-T}^{\bullet}$ ). Los compuestos fenólicos facilitarían la regeneración de  $\alpha\text{-T}$  a partir de los radicales  $\alpha\text{-T}^{\bullet}$  (Frank et al., 2006). Por otro lado, para explicar las interacciones entre los compuestos fenólicos y otros antioxidantes, también se ha propuesto el reciclaje de los radicales aroxilo gracias a la interacción con antioxidantes como el ascorbato, que a su vez sería regenerado por el glutatión (GSH) (Pietta, 2000).

A pesar de la abundante literatura sobre la capacidad antioxidante de los compuestos fenólicos, es necesario considerar que son, en general, poco biodisponibles y en gran parte biotransformados en el organismo, como se ha mencionado anteriormente. Por lo tanto, sus niveles como tales en fluidos corporales, tejidos y células son, por lo general, muy bajos y están por debajo de los de otros antioxidantes fisiológicos, como  $\alpha$ -tocoferol, ascorbato o GSH. Hoy en día, otras hipótesis, como la posibilidad de que los compuestos fenólicos puedan actuar como moduladores potenciales de las cascadas de señalización intracelular, vitales para la función celular, independientemente de su capacidad antioxidante clásica, se consideran más probables para explicar su actividad *in vivo* (González-Paramás et al., 2019).

### **2.1.6 Mecanismos moleculares implicados en envejecimiento y respuesta a estrés**

Los estudios con *C. elegans* han demostrado que existe un gran número de genes y vías de señalización, que regulan el envejecimiento y la respuesta al estrés en este organismo, que están altamente conservados en los mamíferos (Shen, P. et al., 2018). En este sentido, existen numerosos trabajos que describen la modulación de mecanismos moleculares implicados en estos factores por parte de los compuestos fenólicos en *C. elegans*, como los recogidos en el apartado 2.2.5. A continuación, se describen algunas de las rutas más importantes que controlan procesos biológicos fundamentales, entre los que se encuentran el desarrollo, el metabolismo, la reproducción, el control del ciclo celular, la resistencia al estrés y la longevidad.

2.1.6.1 Ruta de señalización de la insulina/IGF-1

La ruta de señalización de la insulina/factor de crecimiento similar a insulina tipo 1 (IGF-1, *Insulin-like Growth Factor*), conocida abreviadamente como IIS, es responsable de regular el envejecimiento y el metabolismo en muchos organismos, desde invertebrados simples hasta mamíferos (Altintas et al., 2016).

La insulina y el IGF-1 ejercen sus efectos biológicos al unirse y activar los receptores transmembranales de tirosina quinasa en la superficie celular. El receptor activado es capaz de fosforilar una variedad de sustratos, principalmente a miembros de la familia de proteínas IRS (sustratos del receptor de insulina). Las proteínas IRS fosforiladas promueven el reclutamiento y la activación de componentes de las cascadas posteriores, como son las rutas de la quinasa-3-OH fosfatidilinositol (PI3K)/Akt, Ras/MAPK (proteínas quinasas activadas por mitógenos) y de mTOR. El papel de la IIS en la conexión de las funciones de todo un organismo, desde crecimiento, reproducción y envejecimiento hasta el estado nutricional, está ampliamente conservado en los sistemas animales (Murphy y Hu, 2013). En la Figura II.8 se recoge un esquema de la ruta de señalización de la insulina (IIS) en *C. elegans*.

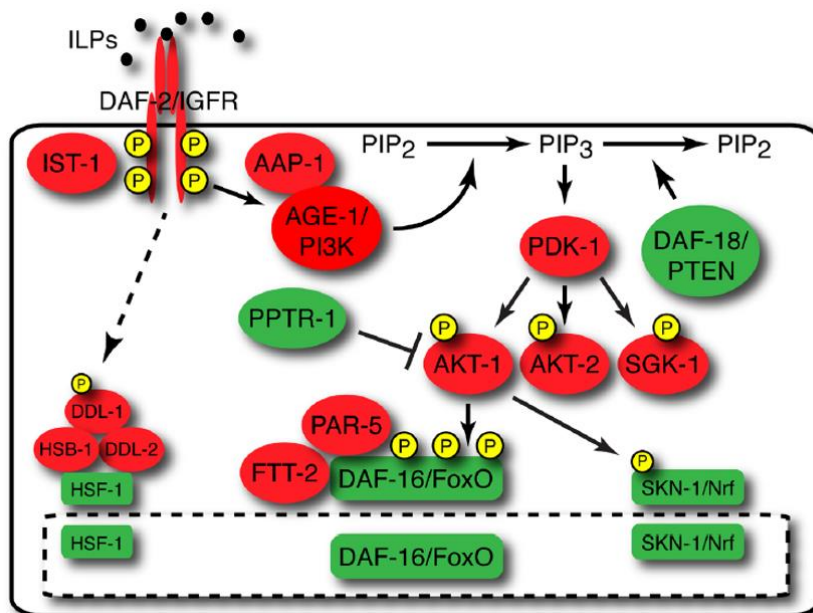


Figura II.8. Ruta de señalización de la insulina (IIS) en *C. elegans*.

Fuente: <http://www.wormbook.org>.

Muchos componentes de la IIS en *C. elegans* están conservados evolutivamente, como *daf-2* y *age-1*, que codifican el único receptor de insulina/IGF-1 en el gusano y PI3K, respectivamente (Shen, P. et al., 2018). Las señales ambientales, como puede ser la disponibilidad de alimento, generan una señal nerviosa que resulta en la liberación de uno o más péptidos similares a insulina (ILPs) (Braeckman y Vanfleteren, 2007). En el genoma de *C. elegans* se han encontrado 40 genes que codifican ILPs (Lapierre y Hansen, 2012). Estos péptidos pueden unirse al receptor DAF-2 que da como resultado el reclutamiento y la activación de AGE-1/PI3K. A su vez, se activan las serina/treonina quinasas (PDK-1, AKT-1 y AKT-2), lo que resulta en la fosforilación del factor de transcripción DAF-16. En *C. elegans*, *daf-16* codifica un factor de transcripción ortólogo de FoxO (*Forkhead box O*) en mamíferos, que desempeña un papel esencial en la mediación de IIS en sentido descendente, regulando procesos como crecimiento, metabolismo, respuesta a estrés, control del ciclo celular o longevidad en muchos organismos. La fosforilación de DAF-16/FoxO determina sus interacciones con las proteínas homólogas de la familia de proteínas 14-3-3 (PAR-5 y FTT-2), que controlan la localización subcelular de DAF-16/FoxO en el citoplasma. La fosfatasa lipídica DAF-18/PTEN y la serina/treonina fosfatasa PPTR-1/PP2A contrarrestan la señalización AGE-1/PI3K y AKT-1, respectivamente (Murphy y Hu, 2013). Se ha descrito que la inhibición o eliminación tanto de *daf-2* o *age-1* amplía el tiempo de vida en *C. elegans* a través de la activación de DAF-16/FoxO, al aumentar su translocación del citoplasma al núcleo, lo que induce la expresión de genes que promueven la longevidad (Altintas et al., 2016).

El análisis genético indica que DAF-16/FoxO es el principal producto transcripcional de IIS, sin embargo, otros factores de transcripción que participan en la regulación de la expresión del gen diana de DAF-16/FoxO también están regulados por IIS, como son HSF-1 y SKN-1. Los factores de transcripción DAF-16, HSF-1 y SKN-1 regulan la expresión de muchos genes diana relacionados con la longevidad, la tolerancia al estrés y la supresión del plegamiento incorrecto de proteínas, como, por ejemplo, el gen de la catalasa (*ctl-1*), de superóxido dismutasa-3 (*sod-3*), o de chaperonas moleculares (p.ej., proteína pequeña de choque térmico, *hsp-16.2*). Además, DAF-16/FoxO interactúa con factores

adicionales en el núcleo, como SIR-2.1 (Hsu et al., 2003; Murphy et al., 2003; Antebi, 2007).

El factor de transcripción de choque térmico 1 (HSF-1) controla la expresión génica inducida por el estrés y también la homeostasis del plegamiento de proteínas (Morley y Morimoto, 2004). Además, cuando se sobreexpresa extiende la longevidad de manera dependiente de DAF-16/FoxO. HSF-1 y DAF-16/FoxO promueven la longevidad mediante la unión a HSEs (elementos de choque térmico) y DBEs (elementos de unión a DAF-16/FoxO) en los promotores de genes que codifican proteínas de choque térmico pequeñas implicadas en la proteostasis (Hsu et al., 2003). La ruta de señalización de la insulina/IGF-1 regula la actividad de HSF-1 al promover la formación de un complejo multimolecular que contiene las proteínas conservadas DDL-1 y DDL-2, que secuestran a HSF-1 en el citoplasma e inhiben su actividad (Chiang et al., 2012).

Como se ha mencionado, el estrés oxidativo desempeña un papel importante en el envejecimiento normal al causar daño oxidativo perjudicial al azar en una variedad de tejidos (Muller et al., 2007). En este sentido, las proteínas Nrf/CNC de mamíferos (Nrf1, Nrf2, Nrf3 y p45 NF-E2) realizan una amplia gama de funciones de protección y mantenimiento celular. La más descrita de estas proteínas, el factor nuclear eritroide 2 (Nrf2), es conocida por ser un regulador de la defensa xenobiótica y antioxidante (Blackwell et al., 2015). Nrf2 regula la expresión de genes de enzimas destoxicantes de fase II y proteínas antioxidantes, como SOD, GST, GPx, NAD(P)H-quinona oxidoreductasa (NQO-1) o GSH (Nguyen et al., 2009; Chen, J. et al., 2014). En *C. elegans*, *skn-1* codifica una secuencia y un ortólogo funcional de las proteínas Nrf/CNC. Bajo condiciones de estrés oxidativo, el SKN-1 se activa a través de la translocación al núcleo, lo que induce la expresión de los genes involucrados en la respuesta al estrés oxidativo. Algunos de sus objetivos posteriores parecen compartirse con DAF-16/FoxO (An et al., 2005). Como en el caso de HSF-1, SKN-1 también contribuye al aumento de la longevidad en animales con IIS reducido. La ruta de señalización de la insulina/IGF-1 inhibe la actividad de SKN-1 al promover su secuestro citoplásmico a través de un sustrato RxRxxS/T que puede ser fosforilado directamente por Akt/PKB y quinasas relacionadas (Tullet



et al., 2008). La mutación en *skn-1* conduce a una disminución de la resistencia al estrés oxidativo y acorta la longevidad, mientras que la sobreexpresión de SKN-1 contribuye a aumentar la longevidad y la resistencia al estrés oxidativo (An y Blackwell, 2003; An et al., 2005; Tullet et al., 2008).

#### 2.1.6.2 Vía de señalización SIR-2.1/SIRT1

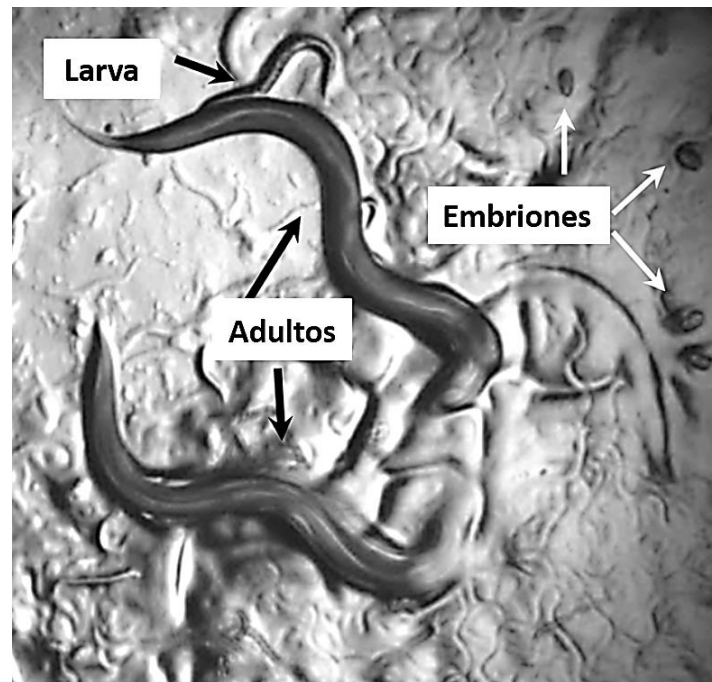
Las sirtuinas pertenecen a una familia de proteínas desacetilasas que actúan predominantemente de manera dependiente a la nicotinamida adenina dinucleótido (NAD). Esta familia de proteínas está conservada evolutivamente en muchos organismos (Shen, P. et al., 2018). En *C. elegans*, *sir-2.1* codifica la sirtuina homóloga de SIRT1 en mamíferos, y responde a los cambios metabólicos en el entorno celular, incluida la disponibilidad de nutrientes, energía y estrés celular (Viswanathan y Tissenbaum, 2013). La sobreexpresión de SIR-2.1 extiende la longevidad, lo que sugiere que *sir-2.1* es un regulador conservado del proceso de envejecimiento. En este sentido, los estudios en *C. elegans* sugirieron por primera vez un papel para las sirtuinas en la regulación de FoxO, ya que se ha demostrado que el aumento de la expresión de *sir-2.1* extiende la longevidad de una manera dependiente de DAF-16/FoxO (Tissenbaum y Guarente, 2001). Las sirtuinas interactúan físicamente con DAF-16 *in vivo* en *C. elegans* (Berdichevsky et al., 2006) y con FoxO en células de mamíferos intactas (Brunet et al., 2004; Daitoku et al., 2004; Motta et al., 2004; van der Horst et al., 2004). Además, se ha descrito que, en respuesta al choque térmico, la asociación física de SIR-2.1 y DAF-16/FoxO requiere de las proteínas 14-3-3 (Berdichevsky et al., 2006). Esta información sugiere que SIR-2.1 puede controlar el estado de acetilación de DAF-16/FoxO de una manera análoga a la regulación de los factores de transcripción de FoxO de mamíferos por SIRT1 (Brunet et al., 2004; Motta et al., 2004; van der Horst et al., 2004).

## 2.2 *Caenorhabditis elegans*

### 2.2.1 Características generales

*Caenorhabditis elegans* es un nematodo redondo de vida libre, de pequeño tamaño, que vive en muchas partes del mundo y se alimenta de microbios, principalmente bacterias como *Escherichia coli* o *Bacillus subtilis* (Hope, 1999). *C. elegans* fue descrito por primera vez en 1900 como *Rhabditis elegans* por Emile Maupas (Maupas, 1900). Este nematodo pertenece a la familia Rhabditidae y su significado etimológico es *Caeno*: nuevo, *rhabditis*: varilla, *elegans*: bonito (Wood, 1988). En el año de 1965 fue propuesto como un modelo genético para comprender cuestiones de la biología del desarrollo y la neurobiología por Sydney Brenner (Brenner, 1974). Posteriormente, este investigador, junto con Robert Horvitz y John Sulston, fueron reconocidos con el Premio Nobel en Fisiología y Medicina de 2002 por sus trabajos sobre la regulación genética del desarrollo y muerte celular programada con este nematodo (Corsi et al., 2015). La cepa más utilizada en investigación es la cepa Bristol, que fue aislada en 1951 de detritos de hongos por Warwick Nicholas durante un curso de nematología organizado por L. N. Staniland en Bristol, Inglaterra (Nigon y Félix, 2017). A partir de esta cepa Sydney Brenner obtuvo la cepa N2 que es la cepa silvestre de referencia en la actualidad (Wood, 1988). Desde entonces *C. elegans* se ha convertido en un organismo modelo importante para la investigación biológica en diversos campos, como genómica, neurociencias, biología celular y estudio del envejecimiento (Corsi et al., 2015).

Las larvas de *C. elegans* recién eclosionadas tienen una longitud de unos 0,25 mm y los adultos presentan un tamaño aproximado de 1 mm de longitud y 70-80  $\mu$ m de diámetro. Su pequeña dimensión y la transparencia de su cuerpo permiten la observación interna de sus células y sus órganos mediante el uso de microscopios de disección (Figura II.9), que generalmente permiten hasta 100 veces de aumento, o microscopios compuestos, que permiten hasta 1000 veces de aumento (Corsi et al., 2015).



**Figura II.9.** *C. elegans* observado a través de un microscopio de disección.

Fuente: <http://www.wormbook.org>

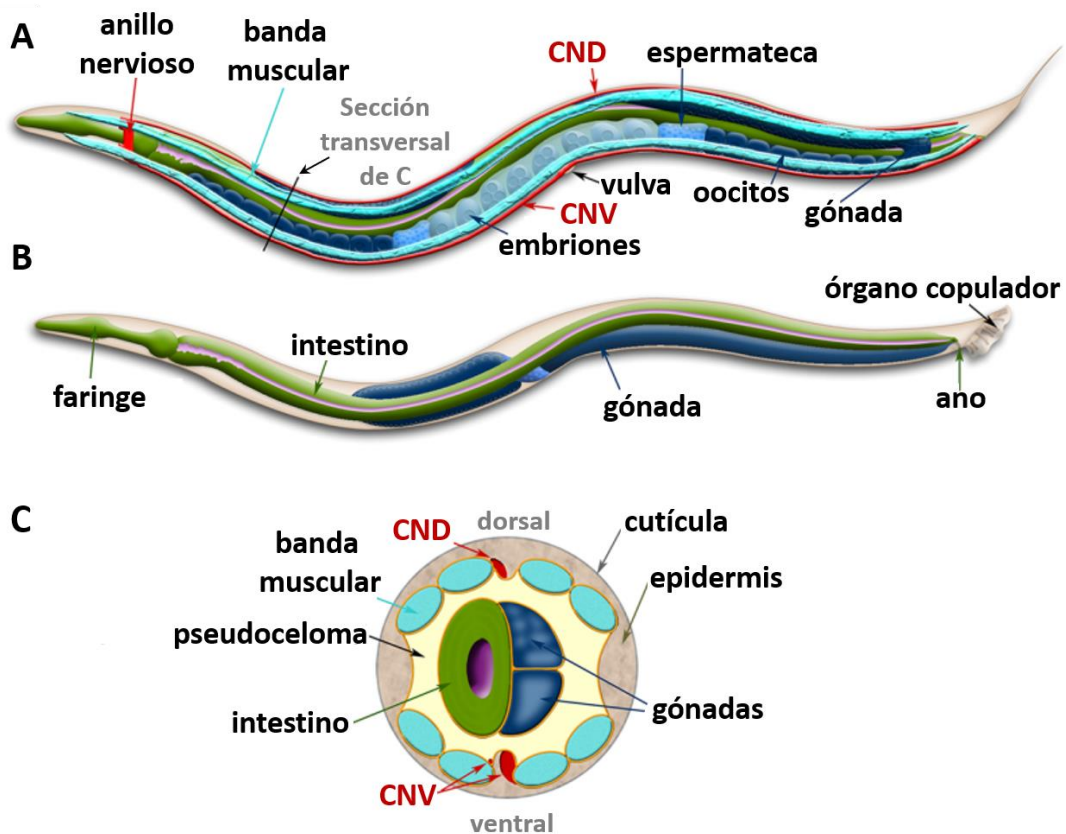
Sus movimientos son ondas sinusoides en el eje dorso-ventral. Existen dos formas sexuales, macho y hermafrodita autofertilizante, lo que hace posible cultivarlos en el laboratorio en grandes cantidades, tanto en medio líquido como en placas de Petri de agar. Además, únicamente necesita un ambiente húmedo, temperatura ambiente entre 10 y 25 °C, oxígeno atmosférico y una fuente de alimento, como son las cepas no patógenas de la bacteria *E. coli*.

*Caenorhabditis elegans* se caracteriza por presentar eutelia, es decir, un número constante de células (el gusano macho presenta 1031 células somáticas y el gusano hermafrodita 959). Además, posee un linaje celular prácticamente invariable (Sulston et al., 1983). Estas características han sido claves para la detección y obtención fiable de fenotipos mutantes (Hope, 1999). En 1998, se convirtió en el segundo eucariota, después de *Saccharomyces cerevisiae*, y el primer organismo multicelular para el cual se obtuvo una secuencia completa del genoma. Siendo el tamaño de su genoma de 100.258.171 pares de bases (Hodgkin, 2005).

## 2.2.2 Anatomía

### 2.2.2.1 Morfología

En la Figura II.10 se puede observar la anatomía general de *C. elegans*, que al igual que otros nematodos tiene una forma de cuerpo cilíndrico no segmentado, que se estrecha en los extremos. El plano de su cuerpo está formado por un tubo exterior y un tubo interior separados entre sí por un espacio pseudocelómico. El tubo externo consta de una cutícula de colágeno que protege al animal del medio ambiente, mantiene la forma del cuerpo y permite la motilidad del nematodo actuando como un esqueleto externo (Riddle et al., 1997).



**Figura II.10.** Diagrama de *C. elegans*. Principales características anatómicas de un hermafrodita (A) y un macho (B). (C) Sección transversal de la parte posterior de *C. elegans*. CND hace referencia al cordón nervioso dorsal y CNV al cordón nervioso ventral. Fuente: <http://www.wormatlas.org/>.

A continuación del tubo externo, se encuentra la epidermis y dentro de ella se localizan las bandas musculares, que controlan el movimiento del

organismo, así como los cordones nerviosos ventral y dorsal que inervan los músculos. El tubo interno está formado por los sistemas digestivo, excretor y reproductivo. Todos estos tejidos están bajo una presión hidrostática interna, regulada por un sistema de osmorregulación. Además, *C. elegans* tiene seis células en la cavidad pseudocelómica, llamadas celomocitos, que se comportan de forma similar a los macrófagos de los vertebrados, aunque tienen una posición fija dentro del animal (Grant y Sato, 2006).

#### 2.2.2.2 Sistema nervioso

El sistema nervioso del gusano hermafrodita cuenta con 302 neuronas, mientras que el del gusano de sexo masculino cuenta con 383 neuronas. Las neuronas extras de los machos se encuentran localizadas en la cola masculina especializada para la cópula. La mayoría de las células del sistema nervioso están dispuestas en ganglios en la cabeza, en la médula ventral y en la cola. En general, las neuronas tienen una estructura simple con una o dos neuritas que salen del cuerpo celular. Sin embargo, algunas neuronas como las neuronas mecanosensoriales, tienen neuritas elaboradamente ramificadas (Dong et al., 2013). Las neuritas forman sinapsis entre sí en cuatro áreas principales: el anillo nervioso que rodea a la faringe, el cordón nervioso ventral, el cordón nervioso dorsal y el neurópilo de la cola. Además de las neuronas, *C. elegans* tiene varias células de soporte tipo glía, que se asocian principalmente con las neuronas sensoriales, pero no son tan numerosas como en los vertebrados (Oikonomou y Shaham, 2011).

#### 2.2.2.3 Sistema inmune

Como se mencionó anteriormente, dentro de la cavidad pseudocelómica del nematodo se encuentran los celomocitos. Estas células esféricas se caracterizan porque tienen grandes inclusiones citoplasmáticas y vacuolas, y funcionan como células depuradoras que endocitan diferentes macromoléculas que clasifican y eliminan en la cavidad pseudocelómica del nematodo. Por lo tanto, se ha sugerido que estas células comprenden un sistema inmune primitivo en *C. elegans* (Grant y Sato, 2006).

#### *2.2.2.4 Sistema digestivo*

El sistema digestivo se divide en el intestino anterior (estomodeo; cavidad bucal y la faringe), el intestino medio y el intestino grueso (proctodeum; recto y ano en hermafroditas y cloaca en los machos) y contiene un total de 127 células. Se extiende de la cabeza a la cola y está recubierto por una membrana basal que lo separa del espacio pseudocelómico (Bird y Bird, 1991).

Los alimentos, generalmente bacterias, ingresan a la parte anterior del nematodo y pasan a través de la faringe, una bomba neuromuscular de dos lóbulos que tritura la comida antes de pasarla al intestino para su digestión. El comportamiento de bombeo de los animales depende de la disponibilidad y la calidad de alimentos; por ejemplo, los animales bombean más cuando tienen hambre y menos cuando están saciados. El intestino está compuesto por 20 células dispuestas para formar un tubo con una luz central. Las superficies apicales de las células intestinales llevan numerosas microvellosidades para incrementar el área de absorción. El contenido intestinal se excreta al exterior a través de una válvula rectal que conecta el intestino con el recto y el ano (Corsi et al., 2015). Además de ser responsable de la digestión y la absorción de nutrientes, el intestino lleva a cabo la síntesis y el almacenamiento de macromoléculas (Shen, P. et al., 2018).

#### *2.2.2.5 Sistema excretor*

El sistema excretor es el encargado de la osmorregulación y la eliminación de desechos. Está formado por cuatro tipos de células: una célula que forma un canal excretor que recorre todo el cuerpo longitudinalmente, una célula de conducto, una célula de poro (célula más grande del nematodo) y un par de células de glándula fusionadas que conectan con la célula del conducto y del poro. Estas células están situadas en el lado ventral de la cabeza posterior y el sistema excretor se abre al exterior a través del poro excretor (Nelson y Riddle, 1984).

#### *2.2.2.6 Sexo y sistema reproductor*

Como se mencionó anteriormente, existen dos sexos para *C. elegans*, macho y hermafrodita. Los machos surgen con poca frecuencia (0,1 %) por la no

disyunción espontánea en la línea germinal hermafrodita y con mayor frecuencia (hasta 50 %) a través del apareamiento. La autofertilización del hermafrodita permite que los gusanos homocigotos generen una progenie genéticamente idéntica y el apareamiento masculino facilita el aislamiento y el mantenimiento de las cepas mutantes, así como las mutaciones en movimiento entre las cepas (Jorgensen y Mango, 2002).

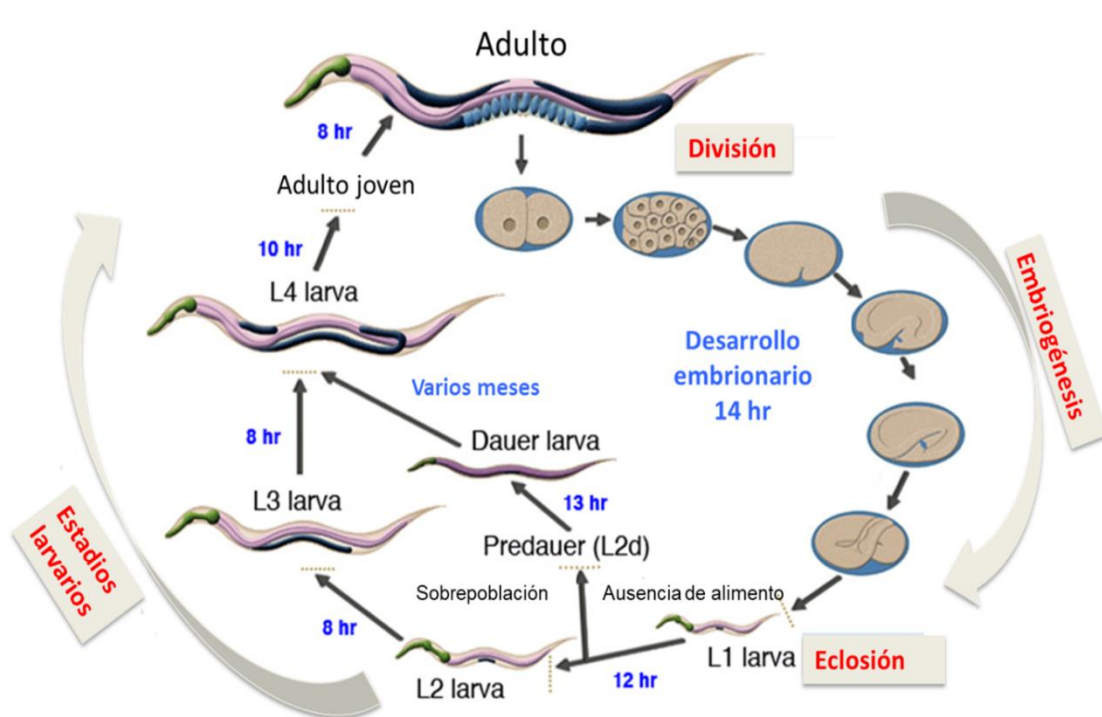
*C. elegans* tiene 5 pares de cromosomas somáticos y uno sexual, que difieren en que los hermafroditas tienen dos cromosomas X y el de los machos es haploide (XO) (Zarkower, 2006).

Existen diferencias anatómicas evidentes entre las estructuras sexuales de los dos sexos de *C. elegans*. Los gusanos adultos hermafroditas son estructuralmente femeninos, ya que producen oocitos y el esperma es producido al final de la etapa larvaria y almacenado en su espermateca (Wood, 1988). La gónada somática de ambos sexos se encuentra en el centro del cuerpo del nemátodo junto al intestino. En hermafroditas, la gónada consiste en dos lóbulos simétricos en forma de U que terminan en un útero común; en los machos, la gónada consiste en un único lóbulo en forma de U. Ambas gónadas albergan la línea germinal donde se desarrollan los oocitos y los espermatozoides. Los gusanos hermafroditas cuentan con una vulva que está situada ventralmente en la mitad del nemátodo y es el conducto para la entrada de espermatozoides del macho al útero (Corsi et al., 2015). Los machos cuentan con una vesícula seminal donde se maduran y almacenan los espermatozoides hasta el momento de la eyaculación. La vesícula seminal conecta a través de un vaso deferente con la cloaca y con las espículas copulatorias para expulsar el esperma durante la cópula (Hope, 1999).

Otras características en las que difieren ambos sexos son que el gusano adulto macho es más delgado que el hermafrodita debido a su gónada más pequeña y la ausencia de embriones en desarrollo, y que la cola de los machos se aplana en un abanico de material cuticular con 18 proyecciones de neuronas y células de soporte asociadas llamadas rayos. Mientras que los hermafroditas presentan una cola que termina en una simple punta (Corsi et al., 2015).

### 2.2.3 Ciclo de vida

El ciclo de vida de *C. elegans* (Figura II.11) comprende la etapa embrionaria y cuatro estadios larvarios (L1-L4), con una duración aproximada de 3,5 días a 20 °C, hasta la etapa de edad adulta. Variaciones en la temperatura pueden acelerar o retrasar su desarrollo, pasando a completarse el ciclo en 3 días a 25 °C y en 6 días a 10 °C (Byerly et al., 1976).



**Figura II.11.** Ciclo de vida de *C. elegans* a 22 °C. Fuente: <http://www.wormatlas.org/>.

La embriogénesis de *C. elegans* tiene una duración aproximada de 16 h a 20 °C y ocurre desde la fertilización hasta la eclosión del huevo. Durante esta fase tiene lugar la proliferación celular, así como la organogénesis y morfogénesis (Sulston et al., 1983). El embrión hermafrodita eclosiona con 558 núcleos y se convierte en una larva L1. Los animales comienzan a comer y desarrollarse a través de los cuatro estadios larvarios (L1-L4). La etapa L1 tiene una duración aproximada de 16 h; mientras que las otras etapas duran aproximadamente 12 h. Cada etapa finaliza con una muda y en la última muda se forma el individuo adulto (Cassada y Russell, 1975). El adulto hermafrodita es fértil durante aproximadamente 4 días; al finalizar este periodo el gusano adulto vive entre 10-15 días más (Hodgkin, 1988).



En condiciones ambientales adversas, como son la falta de alimento, una densidad poblacional muy alta o temperaturas elevadas, las larvas L2 activan un ciclo de vida alternativo y mudan a una etapa larvaria alternativa L3 denominada larva *dauer*. La larva *dauer* presenta una cutícula especializada y es capaz de sobrevivir varios meses en este estado. Cuando las condiciones ambientales son favorables de nuevo, reanudan su desarrollo alimentándose y mudando a L4 (Hope, 1999).

#### **2.2.4 *Caenorhabditis elegans* como organismo modelo**

En la actualidad, *C. elegans* se ha convertido en uno de los principales organismos modelo en Biología, dando lugar a importantes descubrimientos en esta área (Nigon y Félix, 2017). *C. elegans* ha desempeñado un papel fundamental en la elucidación de las vías genéticas que controlan procesos celulares importantes, como son: el desarrollo, la muerte celular y el envejecimiento (O'Reilly et al., 2014). Entre las herramientas genéticas de las que se dispone para trabajar con este modelo se encuentran: las deleciones específicas, la mutagénesis, el bombardeo biolístico, las microinyecciones de ADN y la supresión de la expresión génica mediante ARN de interferencia (RNAi) (Shen, P. et al., 2018). *C. elegans* comparte 60-80 % de homología con genes humanos, existiendo una alta conservación de las rutas moleculares y celulares entre *C. elegans* y mamíferos. Además, presentan ortología para 40 % de genes humanos causantes de enfermedades, por lo que, se ha utilizado ampliamente para estudiar enfermedades humanas complejas, incluidas la enfermedad de Alzheimer, la enfermedad de Parkinson, la diabetes o el cáncer (Kaletta y Hengartner, 2006).

Entre otras características favorables que posee *C. elegans* como organismo modelo se encuentran: su pequeño tamaño, la transparencia de su cuerpo, su ciclo de vida corto y su alta tasa de reproducción, la facilidad para su cultivo y el bajo costo de mantenimiento, la criopreservación a largo plazo, así como su desarrollo y número de células invariables. Además, *C. elegans* es benigno para los humanos y no puede crecer a la temperatura corporal humana (Corsi et al., 2015).

### 2.2.5 Estudios sobre compuestos fenólicos en *Caenorhabditis elegans* y otros modelos

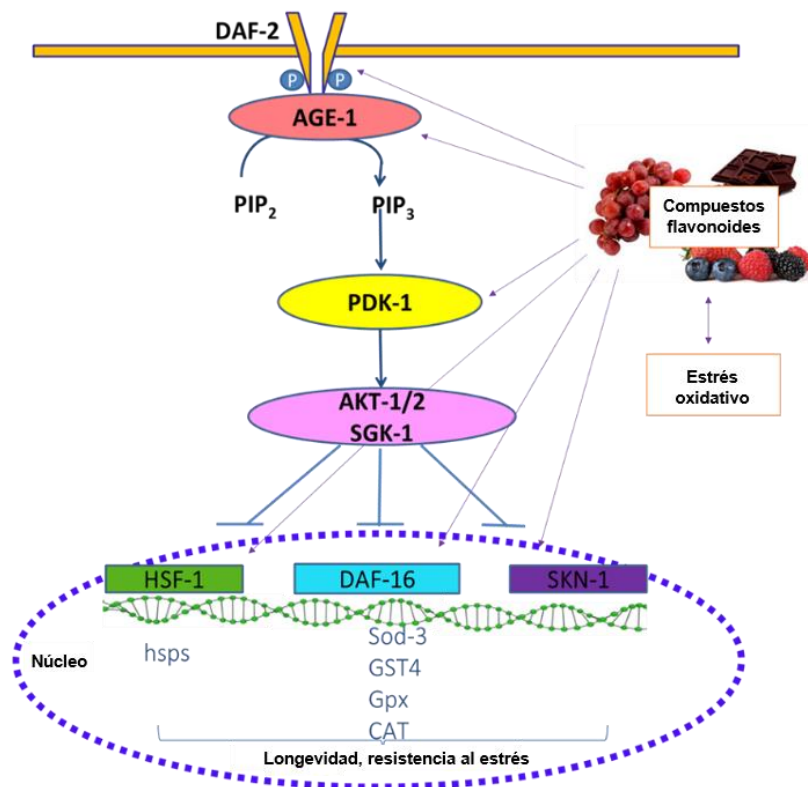
En los últimos años, *C. elegans* ha sido utilizado como organismo modelo para estudiar los efectos y mecanismos a través de los cuales actúan los compuestos fenólicos, principalmente los flavonoides y sus metabolitos, en distintos procesos biológicos, como el envejecimiento y el estrés oxidativo.

Algunos autores encontraron que las catequinas son capaces de prolongar la duración de vida en *C. elegans* (Saul et al., 2009; Bartholome et al., 2010; Saul et al., 2011; Xiong et al., 2018), mientras que otros autores no observaron el mismo efecto con estos flavonoides, aunque si con sus metabolitos metilados (Surco-Laos et al., 2012). Por otro lado, se ha descrito que el tratamiento de *C. elegans* con compuestos fenólicos de la manzana, que contienen principalmente procianidinas, aumenta la longevidad de la cepa silvestre N2 y del mutante *fem-1* (Sunagawa et al., 2011). También se ha observado un aumento significativo en la longevidad para los flavonoles, como quercetina (Surco-Laos et al., 2011). Se ha sugerido que, en los flavonoides, el patrón de hidroxilación del anillo B podría jugar un papel crucial en los efectos sobre la duración de vida del gusano, de modo que cuanto mayor sea el número de grupos hidroxilo, mayor sería su eficacia en este sentido (Koch et al., 2014).

Como se ha mencionado anteriormente, los compuestos fenólicos tienen el potencial de modular el estrés oxidativo intracelular directamente mediante la captación de radicales libres, disminuyendo el nivel basal de ROS y regulando la actividad de enzimas antioxidantes como SOD-3, CAT y GST (González-Paramás et al., 2019). Estos efectos protectores se han observado en *C. elegans* sometido a estrés térmico u oxidativo y tratados con flavonoles como quercetina, miricetina o kaempferol (Surco-Laos et al., 2011; Grünz et al., 2012) o catequinas (Abbas y Wink, 2009; González-Manzano et al., 2012; Surco-Laos et al., 2012), demostrando la capacidad de los flavonoides para mejorar la supervivencia de los gusanos cultivados en condiciones de estrés. Sin embargo, el efecto protector de los compuestos fenólicos no necesariamente se relaciona con la disminución del ROS, sino que, por el contrario, algunos flavonoides podrían inducir un ligero aumento del nivel basal del ROS, que llevaría a activar los mecanismos endógenos de defensa que protegen contra el daño oxidativo resultando en una

mayor protección global, como se pone de manifiesto en el estudio de Ayuda-Durán et al. (2019) en gusanos tratados con epicatequina, tanto de cepas silvestres como mutantes *knockout* en distintos genes de la ruta de la insulina.

Los estudios que utilizan diferentes cepas mutantes han demostrado que los mecanismos que subyacen a la longevidad y los efectos antioxidantes pueden diferir según el flavonoide. El uso de cepas de nematodos mutantes que carecen de la función en genes clave involucrados en la ruta de señalización de la insulina/IGF-1, ha sido una forma de estudiar el potencial de los flavonoides para modular la tolerancia al estrés y la longevidad (Figura II.12) (González-Paramás et al., 2019).



**Figura II.12.** Genes y factores de transcripción de la ruta de señalización de la insulina/IGF-1 estudiados en gusanos mutantes como posibles puntos de actuación relacionados con los mecanismos de acción de flavonoides. Fuente: Modificado de González-Paramás et al. (2019).

En ensayos con distintos flavonoides o extractos fenólicos, algunos autores no encontraron ningún aumento en la duración de vida de la cepa mutante *daf-2*, sugiriendo que este factor tendría un papel mecánico relevante

en el efecto de los compuestos sobre la longevidad del gusano (Pietsch et al., 2009; Saul et al., 2011). Los resultados obtenidos con relación a otros genes de la misma vía en la longevidad de *C. elegans* difieren según el flavonoide. La quercetina no conseguía extender la vida de la cepa mutante *age-1* (Pietsch et al., 2009), mientras que la catequina sí lo hacía (Saul et al., 2011). Por el contrario, la quercetina, pero no la catequina, era capaz de aumentar la duración de vida en el mutante *akt-2* (Pietsch et al., 2009; Saul et al., 2011). Igualmente, se observó que DAF-16 era esencial para la regulación de la longevidad en la acción de kaempferol y miricetina, pero no para quercetina o catequina (Pietsch et al., 2009; Saul et al., 2011; Büchter et al., 2013). Sin embargo, se encontró que DAF-16 estaba relacionado con el aumento en la resistencia al estrés oxidativo, provocado con peróxido de hidrógeno o térmicamente, inducido por distintos flavan-3-oles en *C. elegans* (Martorell et al., 2011; Ayuda-Durán et al., 2019), así como en la disminución de los niveles de ROS en nematodos expuestos a miricetina (Grünz et al., 2012; Büchter et al., 2013). Por el contrario, la disminución del nivel de ROS ejercido por quercetina y kaempferol era independiente de DAF-16 (Grünz et al., 2012). Otros genes de la ruta IIS que se han relacionado con la mejora de la resistencia a estrés térmico de *C. elegans* tratado con epicatequina o quercetina son *daf-2*, *age-1*, *akt-1*, *akt-2*, *sgk-1* (Ayuda-Durán, 2018; Ayuda-Durán et al., 2019). Además, para quercetina se ha descrito la implicación del gen *daf-18* en su efecto de protección frente al estrés en los gusanos (Ayuda-Durán, 2018).

Se sabe que en *C. elegans* los miembros de la familia de proteínas HSP-16 están involucrados en la termotolerancia y se sugieren también como predictores de longevidad (Mendenhall et al., 2012). Se ha demostrado que diferentes flavonoides son capaces de modular la expresión de HSP-16.2 inducida térmica- o químicamente mediante tratamiento con juglona (Strayer et al., 2003; Abbas y Wink, 2009; Zhang et al., 2009, Ayuda-Durán, 2018; Ayuda-Durán et al., 2019). Además, también se ha descrito un aumento en la expresión de otra proteína de choque térmico (HSP-70) y de una enzima detoxificante de fase II (GST-4) en gusanos tratados con epicatequina (Ayuda-Durán et al., 2019).

Varios autores también han demostrado que los flavonoides poseen la capacidad de aumentar la expresión de *skn-1* e inducir la translocación de SKN-

1 al núcleo (Saul et al., 2009; Zhang et al., 2009). Además, se ha descrito la implicación de SKN-1 en la protección frente a estrés térmico en gusanos tratados con epicatequina o quercetina (Ayuda-Durán, 2018; Ayuda-Durán et al., 2019). Sin embargo, este mecanismo no parece ser común para todos los flavonoides, por ejemplo, la expresión génica de *skn-1* no parece estar involucrada en la longevidad mediada por miricetina, catequina o procianidinas en *C. elegans* (Saul et al., 2009; Büchter et al., 2013).

Los estudios con metabolitos fenólicos colónicos en *C. elegans*, u otros modelos animales, son muy escasos. La mayoría de los efectos biológicos que pueden tener estos metabolitos se han demostrado en modelos *in vitro* (Tomás-Barberán et al., 2018). Diferentes autores han descrito que funciones fisiológicas de los catabolitos fenólicos, como la actividad antioxidante, antiinflamatoria y antiproliferativa, pueden diferir de las de los compuestos originales (Kawabata et al., 2019). Así, por ejemplo, algunos catabolitos de quercetina, como PCA, VA, DHPAA y DHCA, muestran una actividad antioxidante menor que el compuesto original (Dueñas et al., 2011).

Gao et al. (2006) estudiaron el efecto antiproliferativo de distintos flavonoides de té verde, de té negro y de cítricos y de sus catabolitos, entre ellos el DHPAA, en células de cáncer de colon y de próstata, observando un menor efecto antiproliferativo de los flavonoides precursores del DHPAA. También se ha observado que el efecto inhibitorio de algunos ácidos fenólicos, incluidos el DHPAA y el DHCA, sobre la producción de NO en macrófagos activados es mínimo en comparación con el efecto de su flavonoide precursor (Kawabata et al., 2013). Sin embargo, se ha descrito una actividad antioxidante y antiinflamatoria similar para la procianidina A2 y su catabolito microbiano, 3,4-HPA, cuando se aplicaban en la misma concentración en una línea celular de macrófagos (Zhang, Y.Y. et al., 2018).

A continuación, se describen más detalladamente distintos ensayos que se han llevado a cabo con los metabolitos fenólicos colónicos que son objeto de estudio en esta Tesis Doctoral.

### 2.2.5.1 Ácido protocatéquico

Se han atribuido diferentes actividades biológicas y farmacológicas al PCA, entre las que se incluyen propiedades antioxidantes, antimicrobianas, anticancerígenas, antiulcerosas, antidiabéticas, antienviejecimiento, antiinflamatorias y analgésicas, así como efectos protectores cardiovasculares, hepáticos, neurológicos y renales (Kakkar y Bais, 2014; Khan et al., 2015). Un creciente número de evidencias apoya que el PCA puede ejercer estos efectos biológicos al actuar sobre diferentes dianas moleculares (Masella et al., 2012).

La bioactividad del PCA *in vitro* se ha investigado con cierto detalle, con particular atención a su influencia en la proliferación y muerte celular. Se ha descrito que este metabolito tiene efectos apoptóticos en células cancerígenas, encontrando que este efecto podría estar mediado a través de la estimulación de las quinasas c-Jun N-terminal (JNK) y MAPK (Yip et al., 2006; Lin et al., 2007), pero no de las quinasas reguladas por señales extracelulares (ERK), definiendo así un mecanismo de acción muy específico (Lin et al., 2007). En contraste con estos efectos proapoptóticos, se ha descrito que el PCA es capaz de aumentar la viabilidad y de estimular la proliferación de células madre neurales cultivadas, probablemente asociado a su capacidad para disminuir el nivel de ROS y la actividad de la caspasa-3 (Guan et al., 2009). Estas observaciones sugieren que el PCA puede operar de diferentes maneras en diferentes entornos, actuando de manera proapoptótica en células en proliferación activa, mientras protege las células normales de la apoptosis. Sin embargo, la concentración de PCA utilizada para tratar las células en estos estudios oscilaba entre 0,06 y 8 mM, lo que supera ampliamente los niveles que se pueden encontrar *in vivo* (Vitaglione et al., 2007), haciendo cuestionable en este contexto la relevancia de los efectos observados *in vitro* para el metabolito.

El estrés oxidativo y los procesos inflamatorios parecen contribuir conjuntamente a la fisiopatología de casi todas las enfermedades crónicas degenerativas. La generación de ROS, así como de RNS, es capaz de activar factores de transcripción sensibles a estímulos redox, que inducen la expresión de moléculas proinflamatorias que conducen a un estado de inflamación crónica. Por otro lado, la inflamación en sí misma podría contribuir a la generación de

ROS y RNS que amplifique los daños en las células y órganos diana (Masella et al., 2012).

Se han descrito efectos antiinflamatorios del PCA en sistemas *in vitro* e *in vivo*. Así, se ha demostrado que es capaz de reducir los niveles, la expresión o la actividad de biomarcadores proinflamatorios de riesgo coronario, como la molécula de adhesión intercelular 1 (ICAM-1), la molécula de adhesión celular vascular 1 (VCAM-1) y el factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas (NF- $\kappa$ B), en líneas celulares endoteliales y en un modelo murino de aterosclerosis (Wang et al., 2010). Por otro lado, Kim et al. (2014) estudiaron el efecto del PCA extraído de *Veronica peregrine* en *C. elegans* a las concentraciones de 100 y 200  $\mu$ M, y encontraron que aumentaba significativamente la vida media (200  $\mu$ M) y la vida máxima de una manera dependiente de la concentración. Además, observaron que tenía un efecto protector frente a estrés oxidativo, disminuyendo los niveles de ROS y modulando la actividad de enzimas antioxidantes, como CAT y SOD-3. En un ensayo con una línea celular de macrófagos se encontró que el PCA inducía un aumento en la expresión del ARNm de Nrf2 y la translocación de este factor de transcripción al núcleo para unirse a las secuencias ARE específicas presentes en los promotores de enzimas antioxidantes endógenas (Vari et al., 2011).

#### 2.2.5.2 Ácido vanílico

Se han descrito diferentes actividades biológicas beneficiosas ejercidas por el VA, como acciones antioxidante, antibacteriana, antimicrobiana, cardioprotectora, hepatoprotectora, neuroprotectora y antiapoptótica (Calixto-Campos et al., 2015; Almeida et al., 2016).

En estudios en células endoteliales humanas se encontró actividad antiinflamatoria para el VA, al reducir los niveles de VCAM-1 (Warner et al., 2017) y de la citocina proinflamatoria IL-6 (Amin et al., 2015; Warner et al., 2017). Kumar et al. (2014) describieron un efecto de cardioprotección en ratas con hipertensión inducida y, en diversos modelos murinos de inflamación, Calixto-Campos et al. (2015) encontraron que el VA presentaba actividad analgésica y antiinflamatoria, relacionadas con sus efectos antioxidantes y capacidad para inhibir la producción de citocinas proinflamatorias asociada con NF- $\kappa$ B. Amin et

al. (2017) también describieron para el VA un efecto de neuroprotección frente a la neurotoxicidad inducida en ratones. Por otro lado, Cheng et al. (2014) en ensayos en *C. elegans* con un extracto de hojas de *Chamaecyparis obtusa* var. *formosana* que, entre otros 6 compuestos fenólicos, contenía VA, encontraron que el tratamiento con el mismo aumentaba la longevidad y disminuía los niveles de ROS en el gusano.

#### 2.2.5.3 Ácido 3,4-dihidroxifenilacético

Algunos estudios *in vitro* han evidenciado una alta capacidad antioxidante para el DHPAA, que se ha relacionado con la presencia de un grupo catecol en su estructura (Jaganath et al., 2009; Tang et al., 2016). Gao et al. (2006) evaluaron el posible efecto antiproliferativo de distintos ácidos fenólicos en líneas celulares de cáncer, encontrando que el único compuesto que presentaba actividad anticancerígena entre los metabolitos fenólicos ensayados era el DHPAA. Carrasco-Pozo et al. (2015) estudiaron la posible actividad protectora de este metabolito en células pancreáticas  $\beta$  con altos niveles de colesterol, encontrando que era capaz de aumentar la translocación de Nrf2 al núcleo, protegiendo a las células contra la secreción alterada de insulina al prevenir el estrés oxidativo, la apoptosis y la disfunción mitocondrial. En ensayos *in vitro* también se ha descrito un efecto neuroprotector del DHPAA, al observar que prevenía la apoptosis neuronal mediante la disminución de los niveles de ROS y de la actividad de la caspasa-3 (González-Sarrías et al., 2017).

#### 2.2.5.4 Ácido 3-(4-hidroxifenil)-propiónico

Existe muy poca información acerca de la actividad biológica de este metabolito. Como se mencionó anteriormente, Zhang, Y.Y. et al. (2018) describieron actividad antioxidante y antiinflamatoria *in vitro* para el 3,4-HPA al inhibir la acumulación lipídica y la conversión de macrófagos en células espumosas. Asimismo, encontraron que era capaz de disminuir el estrés oxidativo y la inflamación inducida por lipoproteínas de baja densidad oxidadas (LDL-ox) en las células.



#### 2.2.5.5 Ácido dihidrocafeico

Se han demostrado diferentes actividades biológicas para el DHCA *in vitro*, como capacidad antioxidante (Huang et al., 2004; Poquet et al., 2008; Baeza et al., 2016; Hu et al., 2018; Wang et al., 2019), antiinflamatoria (Poquet et al., 2008; Hu et al., 2018) y anticancerígena (Miene et al., 2011), así como efectos neuroprotectores *in vitro* (González-Sarrías et al. 2017) y en ratones (Lee et al., 2015). Los resultados obtenidos por Huang et al. (2004) en una línea celular endotelial humana sugieren que el DHCA tiene capacidad de captación de ROS y para aumentar la actividad de NOS endotelial (eNOS) de manera dosis-dependiente. Igualmente, diferentes trabajos han demostrado un efecto hepatoprotector para el DHCA al disminuir los niveles de ROS y de daño macromolecular, al recuperar el GSH agotado (Baeza et al., 2016; Wang et al., 2019), así como por aumentar la actividad de enzimas antioxidantes y la concentración de eNOS (Wang et al., 2019) en células de hepatoma humano (HepG2).

El carácter antioxidante y antiinflamatorio del DHCA se describió también en otro estudio, en el que se demostraba su capacidad para disminuir la citotoxicidad y la producción de citocinas proinflamatorias (IL-6 e IL-8) en células Ha-CaT, un modelo de queratinocitos, sometidas a radiación UV. De acuerdo con los autores, estos efectos podían atribuirse tanto a la captación directa de ROS y al refuerzo de las defensas antioxidantes internas como a una interferencia con la vía implicada en la estimulación de citocinas (Poquet et al., 2008). Por otro lado, en células de adenoma humano LT97, Miene et al. (2011) encontraron que el DHCA era capaz de aumentar la expresión de GST-2 y disminuir la expresión de la ciclooxigenasa-2 (COX-2), relacionada con una actividad proinflamatoria y sobreexpresada en cáncer de colon, reduciendo significativamente el nivel de daño oxidativo del ADN inducido en estas células.

#### 2.2.5.6 Ácido cafeico

Se han descrito distintas actividades biológicas con impacto en la salud humana para el CA, como propiedades antioxidantes, anticancerígenas, antimicrobianas, antivirales, antiinflamatorias e inmunomoduladoras (Dong et al., 2012; Silva et al., 2014; Damasceno et al., 2017). El ácido cafeico es reconocido

por su actividad antioxidante directa a través de la captación de ROS (Silva et al., 2000; Sroka y Cisowski, 2003; Sugahara et al., 2018; Dudylyna et al., 2019) y de la capacidad para quelar metales de transición prooxidantes (Borges et al., 2005), así como por ser capaz de inducir mecanismos relacionados con la mejora de la respuesta citoprotectora mediante la activación de factores de transcripción sensibles a estímulos redox, como Nrf2, y la regeneración de las formas reducidas de antioxidantes endógenos (Ahn et al., 2017; Shen, J. et al., 2018; Dos Santos Nunes et al., 2019).

Pietsch et al. (2011) encontraron que el CA mejoraba la termotolerancia y prolongaba la duración de vida en *C. elegans* actuando sobre distintas vías superpuestas implicadas en el metabolismo y la respuesta al estrés, al observar que el factor de transcripción DAF-16 y las proteínas SIR-2.1, OSR-1, UNK-43 y SEK-1 eran necesarios para los efectos beneficiosos ejercidos por el ácido cafeico.

*III. MATERIALES  
Y MÉTODOS*



## 3.1 Materiales y Equipos

### 3.1.1 Equipos

- Agitador magnético SBS.
- Agitador Vortex IKA Genius 3.
- Autoclave Selecta modelo Presoclave II.
- Balanza analítica Mettler Toledo AG245.
- Baño de agua termostático P-selecta.
- Baño ultrasonido Branson 5510.
- Cabina de flujo laminar Telstar AV-30/70.
- Centrífuga de alta velocidad CR22N (Hitachi).
- Concentrador Savant ISS110 SpeedVac (Thermo Fisher Scientific).
- Equipo de cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC) Agilent Technologies serie 1200.
- Espectrofotómetro Nanodrop 1000 (Thermo Fisher Scientific).
- Espectrómetro de masas 3200 Q-TRAP (Applied Biosystems).
- Espectrómetro de RMN (Bruker Avance 400 MHz).
- Homogeneizador Thermo Savant Fastprep FP120.
- HPLC semipreparativa Agilent Technologies serie 1260 Infinity.
- Incubadores refrigerados Velp modelo FTC 901 y IPP SS Memmert.
- Lector de microplacas FLUOstar Omega BMG LABTECH.
- Liofilizadores Cryodos y LyoQuest (Telstar).
- Microcentrífuga Thermo Heraeus Fresco 17.

- Microscopio estereoscópico de fluorescencia Leica M205 FA.
- Microscopio estereoscópico Leica S9 E.
- pHmetro Crisol Basic 20.
- Placa térmica para tubos eppendorf (P Selecta).
- Plataforma BioMark™ HD Real-Time PCR System (Fluidigm).
- Rotavapores Büchi R-124, con baño de agua termostatizable B-480 y bombas de vacío B-270.
- Sistemas de purificación de agua Direct-Q (Millipore) y Autwomatic (Wasserlab).
- Termociclador SimpliAmp (Applied Biosystems, Thermo Fisher Scientific).

### **3.1.2 Materiales, reactivos y disolventes**

- Acros Organics (New Jersey, Estados Unidos): ácido cafeico (ácido 3,4-dihidroxicinámico, CA).
- Alfa Aesar (Karlsruhe, Alemania): ácido 3-(4-hidroxifenil)-propiónico (3-4HPA), ácido dihidrocafeico (ácido 3-(3,4-dihidroxifenil)-propiónico, DHCA).
- Applied Biosystems (Carlsbad, Estados Unidos): High-Capacity cDNA Reverse Transcription kit.
- Brand GMBH (Wertheim, Alemania): placas microtiter Brand 96 pocillos pureGrade y placas Petri de 35 mm de diámetro.
- Difco (Madrid, España): placas de 90 mm de diámetro.
- Fluka Analytical (Madrid, España): medio triptona y peptona de soja.
- G. E. Healthcare Life Sciences (Buckinghamshare, Reino Unido): kit de aislamiento RNAspin Mini ilustra.

- Invitrogen (Eugene, Estados Unidos): MitoSOX™ Red mitochondrial superoxide indicator.
- MACRON (Gliwile, Polonia): metanol.
- Merck (Darmstadt, Alemania): dihidrógeno fosfato de potasio, monohidrógeno fosfato de potasio, monohidrógeno fosfato de sodio, sulfato de magnesio y metanol.
- Panreac (Barcelona, España): cloruro de sodio, cloruro de calcio, cloruro de hidrógeno, hidróxido de sodio y dimetilsulfóxido (DMSO).
- Sigma-Aldrich (Madrid, España): ácido protocatéuico (ácido 3,4-dihidroxibenzoico, PCA), ácido vanílico (ácido 3-metoxi-4-hidroxibenzoico, VA), ácido 3,4-dihidroxifenilacético (DHPAA), ampicilina sódica, nistatina, agar, extracto de levadura, colesterol, 2',7'-diclorodihidrofluoresceína diacetato (DCFH-DA), peróxido de hidrógeno 30 %, buffer fosfato salino (PBS), 5-fluoro-2'-desoxiuridina (FUdR), dioxano, ácido trifluoroacético (TFA), acetonitrilo y trióxido de azufre-N-trietilamina.
- VWR (Fontenay-sous-Bois, Francia): etanol, ácido fórmico e hidróxido amónico.

### 3.1.3 Material biológico

Los ensayos se realizaron con la cepa silvestre N2 de *Caenorhabditis elegans* y como fuente de alimento se utilizó *Escherichia coli* OP50 resistente a ampicilina. Estos organismos fueron obtenidos del Caenorhabditis Genetic Center (CGC) de la Universidad de Minnesota (Minneapolis, Estados Unidos). Los gusanos se pueden conservar de manera indefinida mediante congelación a -80 °C. Para realizar los ensayos, los gusanos son mantenidos en incubadores termostatzados a una temperatura de 20 °C.

## 3.2 Métodos

### 3.2.1 Preparación del medio de cultivo para *Caenorhabditis elegans* (*Nematode Growth Medium*, NGM)

Se mezclan 1,2 g de NaCl, 6,8 g de agar, 1 g de peptona en 390 mL de H<sub>2</sub>O destilada, para después ser autoclavado durante 60 min. Se atempera en baño de agua a 60 °C durante 20 min. Posteriormente, el medio NGM (*Nematode Growth Medium*) es enriquecido con 10 mL de buffer KPO<sub>4</sub> 1M pH 6,0 (108,3 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 35,6 g K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> en 1L de H<sub>2</sub>O), 400 µL CaCl<sub>2</sub> 1M, 400 µL MgSO<sub>4</sub> 1M, 400 µL de colesterol (5 mg/mL etanol), 400 µL de ampicilina sódica (50 µg/mL) y 700 µL de nistatina 1 % (1 g/100 mL en etanol: acetato de amonio 1:1), todos ellos previamente esterilizados mediante autoclavado. El medio fundido es añadido a las placas Petri de 90 mm de diámetro (20 mL) o a placas Petri de 35 mm de diámetro (5 mL) en condiciones de esterilidad y en la campana de flujo laminar, donde se dejan enfriar. Las placas pueden ser almacenadas durante varios días en refrigeración entre 4 y 8 °C.

### 3.2.2 Preparación de *Escherichia coli* OP50 como fuente de alimento

Las colonias aisladas de *E. coli* OP50 son almacenadas en placas de LB Agar preparado con 3,4 g de agar, 2 g de medio triptona, 1 g de extracto de levadura, 1 g de NaCl y 200 mL de agua destilada. Todo ello esterilizado en autoclave. Tras mantenerlo 20 min en un baño a 60 °C se añaden 200 µL de ampicilina.

Las bacterias son cultivadas en medio líquido L. Broth, que contiene: 10 g de triptona, 5 g de extracto de levadura, 5 g de NaCl en 1L de H<sub>2</sub>O destilada. El pH se ajusta a un valor de 7 con NaOH 1M, y el medio de cultivo es esterilizado en autoclave. Para realizar el cultivo de estas bacterias se ponen 50 mL del medio L. Broth en un Erlenmeyer previamente autoclavado, se añaden 50 µL de ampicilina y se inocula una colonia aislada de *E. coli* OP50. El medio L. Broth es incubado a 35 °C toda la noche, se almacena a 4 °C y puede ser usado durante varias semanas.



Las placas con medio NGM estéril, previamente preparadas y secas, se inoculan con aproximadamente 200  $\mu$ L (placas Petri de 90 mm) y 20  $\mu$ L (placas Petri de 35 mm) del cultivo de *E. coli* en L. Broth. Se forma un césped bacteriano de esta *E. coli* OP50 viva donde se localizarán los gusanos, por lo que se intenta que éste quede centrado en la placa y así evitar la dispersión de los gusanos y facilitar su visualización.

### 3.2.3 Sembrado de *Caenorhabditis elegans* en placas NGM

La siembra de gusanos en placas frescas se realiza transfiriendo un trozo de agar con gusanos desde una placa almacenada a una placa nueva con ayuda de una espátula esterilizada. Los gusanos salen del trozo de agar y se esparcen por el césped bacteriano de la placa fresca.

Para transferir gusanos individualmente se utiliza un asa de siembra de alambre de platino de calibre 32. El gusano que se va a transferir se coge cuidadosamente con el asa de siembra y después se apoya suavemente en la nueva placa de agar permitiendo que el nematodo se desprenda. Este proceso se lleva a cabo bajo la lupa y puede realizarse con varios gusanos a la vez.

Cuando es necesario transferir gran cantidad de gusanos, las placas son lavadas dos veces con 3 mL de buffer M9 (3 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 6 g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 5 g NaCl, 1 mL 1M  $\text{MgSO}_4$ ,  $\text{H}_2\text{O}$  destilada hasta 1 L, esterilizado por autoclavado). La suspensión se centrifuga (60 s, 4000 rpm) y el sobrenadante es eliminado. Para finalizar, los gusanos son transferidos e incubados en nuevas placas de NGM agar.

### 3.2.4 Sincronización de *Caenorhabditis elegans*

La sincronización de *C. elegans* se lleva a cabo para obtener nemátodos de la misma edad o estado larvario. Para ello, se comienza con placas NGM con alto número de gusanos en edad fértil y que tengan gran cantidad de huevos en su interior. A continuación, se recogen los gusanos en un eppendorf con buffer M9 (2 mL), y se centrifugan durante 1 min a 10.000 rpm a 4 °C con el fin de lavar los gusanos. El sobrenadante es retirado y sobre el residuo de gusanos se añaden 150  $\mu$ L de una solución de hipoclorito sódico, preparada con 1 mL de lejía comercial y 500  $\mu$ L de NaOH 5N, con el fin de destruir todas las larvas y la

carcasa de los gusanos adultos sin afectar a los huevos. La mezcla es agitada vigorosamente durante 10 min, alternando cada minuto un ciclo de agitación con vortex y un ciclo de reposo. Después, la mezcla es centrifugada durante 1 min a 10.000 rpm a 4 °C y a continuación se elimina el sobrenadante. El pellet de huevos es lavado 5 veces con buffer M9 para eliminar completamente los residuos de hipoclorito sódico y finalmente se resuspende en 1 mL de solución M9. Esta solución es almacenada a 20 °C en un dispositivo con movimiento rotacional durante unas horas para favorecer la eclosión, posteriormente se dejan en posición horizontal. A las 24 h, aproximadamente, han eclosionado las larvas y pueden ser transferidas a placas de NGM agar para que continúen su desarrollo.

### 3.2.5 Preparación de placas Petri para ensayos con metabolitos fenólicos

Los medios de cultivo enriquecidos con metabolitos fenólicos se preparan en placas de agar NGM, donde es añadido el compuesto a ensayar. Para ello, se parte de una disolución madre de cada compuesto fenólico de 200 mM disuelta en DMSO, de la cual se incorpora un volumen adecuado al agar para obtener la concentración final en el medio de cultivo de 200 µM. Para algunos metabolitos fenólicos se probaron diferentes concentraciones que son descritas en el apartado de resultados de cada compuesto. El agar es previamente calentado en horno microondas, hasta obtener el medio líquido, posteriormente es atemperado 20 min a 60 °C en baño de agua, para evitar la degradación de los metabolitos fenólicos a ensayar. Las placas control son preparadas sin ningún metabolito, pero conteniendo el mismo volumen de DMSO que las placas con tratamiento. La concentración final de DMSO en todas placas es de un 0,1 % (v/v).

Para la mayoría de los ensayos con *C. elegans* es necesario partir y mantener una población sincronizada de nemátodos, por lo tanto, es necesario añadir 5-fluoro-2'-desoxiuridina (FUdR) a las placas a las que son transferidos los gusanos a partir del primer día de adulto. El uso de este compuesto permite prevenir la reproducción de la población sincronizada; ya que inhibe la síntesis de ADN y de proteínas, produciendo la muerte de células mitóticas (Hosono, 1978). Este tratamiento no afecta el desarrollo del nematodo adulto, dado que

las células de estos son en su mayoría células post-mitóticas (Mitchell et al., 1979). El FUDR es preparado a una concentración de 200 mM en agua, y es añadido al medio NGM, obteniendo una concentración final de 200  $\mu$ M.

### **3.2.6 Ensayos de estrés oxidativo inducido térmicamente**

La vida de *C. elegans* es dependiente de la temperatura, existiendo una relación inversa entre la temperatura de cultivo y la vida media del gusano. El ensayo de estrés térmico permite comprobar si los gusanos tratados previamente con algún metabolito fenólico aumentan su resistencia frente al estrés oxidativo inducido térmicamente. Este ensayo es realizado según el método descrito por Saul et al. (2009) con pequeñas modificaciones, como son detalladas a continuación. Se parte de una población de *C. elegans* sincronizada. Las larvas sincronizadas son sembradas en placas NGM de 90 mm de diámetro que contienen el compuesto a ensayar (concentración estándar de 200  $\mu$ M) y en placas control (DMSO 0,1 %). La influencia del estrés térmico sobre la viabilidad del gusano se evalúa en dos estados de desarrollo, el segundo y noveno día de adulto de los nematodos. Al llegar el día del ensayo, los gusanos son transferidos individualmente a placas de 35 mm de diámetro (20 gusanos por placa) y se someten a 35 °C durante 8 h. Durante este ensayo se cuentan los gusanos supervivientes y los muertos a las 6 y 8 h. Se considera que los gusanos están muertos cuando no responde a ningún estímulo, como ligeros toques con el asa de siembra. Se realizaron tres ensayos independientes para cada tratamiento con 100 gusanos por tratamiento.

### **3.2.7 Ensayos de determinación de especies reactivas de oxígeno (ROS)**

#### *3.2.7.1 Ensayos con DCFH-DA*

Los niveles de ROS intracelulares son cuantificados mediante el método de la diclorofluoresceína (Wang y Joseph, 1999), utilizando un lector de microplacas. El ensayo es realizado con una población sincronizada de gusanos, en dos estados de desarrollo de los nematodos, el segundo y noveno día de adultos. Los gusanos son cultivados en las placas con los distintos metabolitos fenólicos o en ausencia de los mismos (grupo control). Al alcanzar la edad

necesaria para realizar el ensayo, son transferidos individualmente a placas de 96 pocillos (un gusano por pocillo), en los que previamente se había añadido 75  $\mu\text{L}$  de PBS. El ensayo se realiza en condiciones de estrés térmico (2 h a 35 °C) y sin estrés. Posteriormente se añaden en cada pocillo 13  $\mu\text{L}$  de 2',7'-diclorodihidrofluoresceína diacetato (DCFH-DA) 150  $\mu\text{M}$ , disuelto en etanol, en cada pocillo. Inmediatamente después de añadir el reactivo, se mide la fluorescencia a intervalos de 10 min, durante 30 minutos, utilizando como  $\lambda$  de excitación y de emisión 485 nm y 535 nm, respectivamente. Se realizaron 3 ensayos independientes de cada tratamiento (provenientes de diferentes sincronizados y cultivados en diferentes placas), con al menos 32 individuos por tratamiento.

DCFH-DA es un reactivo comúnmente utilizado para la detección de varias ROS. Este compuesto es estable y permeable a través de la membrana celular, en donde es hidrolizado a 2',7'-diclorodihidrofluoresceína (DCFH). En presencia de ROS el DCFH es oxidado a un compuesto fluorescente (2',7'-diclorofluoresceína; DCF) (Dikalov y Harrison, 2014). Con este método se pueden detectar varias ROS a las que el DCFH-DA es sensible:  $\text{H}_2\text{O}_2$ ,  $\text{ONOO}^-$  y  $\cdot\text{OH}$ . Otras como  $\text{NO}\cdot$ ,  $\text{HOCl}$  o  $\text{O}_2^{\cdot-}$  no son detectables, ya que no son capaces de oxidar la DCFH (Myhre et al., 2003).

#### *3.2.7.2 Ensayos con MitoSOX*

El reactivo MitoSOX es utilizado como un indicador de la producción de superóxido mitocondrial. MitoSox es una molécula de dihidroetidio (DHE) que se dirige a las mitocondrias mediante la adición de un grupo trifenilfosfonio. DHE es oxidado por  $\text{O}_2^{\cdot-}$  y se forma etidio, que es un compuesto fluorescente (Labuschagne y Brenkman, 2013). Este ensayo es realizado según el método descrito por Qabazard et al. (2014) con algunas modificaciones, que son especificadas a continuación. El ensayo se lleva a cabo el segundo y noveno día de adultos de una población sincronizada de gusanos que son tratados con los distintos metabolitos fenólicos o con DMSO (0,1 %). Al alcanzar la edad necesaria para realizar el ensayo, los gusanos son transferidos manualmente a una placa de 96 pocillos (uno por pocillo), en los que previamente se había añadido 100  $\mu\text{L}$  de PBS. El ensayo se realiza en condiciones de estrés térmico

(2 h a 35 °C) y sin estrés. Posteriormente se añaden 50 µL de MitoSOX 5 µM, disuelto en PBS, en cada pocillo. Con un lector de microplacas se evalúa la fluorescencia cada 10 min, durante 40 min a 35 °C, utilizando como  $\lambda$  de excitación y emisión 510 y 580 nm, respectivamente. Por día y tratamiento se realizaron 3 ensayos independientes, y en cada ensayo los niveles de  $O_2^{\bullet-}$  se determinaron al menos en 16 individuos.

### 3.2.8 Ensayos de longevidad

Los gusanos sincronizados en estado larvario L1 son transferidos a placas NGM de 90 mm de diámetro que contienen el metabolito fenólico a ensayar y a placas control (DMSO 0,1 %). El primer día de adulto de los nematodos son transferidos individualmente a placas de 35 mm de diámetro (20 gusanos por placa) que también contienen los distintos metabolitos y FUDR, siendo transferidos a placas nuevas cada 2 días. La supervivencia de los gusanos es contabilizada durante todo el periodo de vida de estos, considerándolos muertos si no responden al toque suave con el asa de siembra. Se realizaron tres ensayos independientes para cada tratamiento con 100 gusanos por tratamiento.

### 3.2.9 Cuantificación de ARNm por RT-PCR cuantitativa

El RNA total es aislado a partir de los gusanos sembrados en placas NGM que contienen el compuesto fenólico a estudiar y en placas NGM control con DMSO (0,1 %), y son cultivados durante 5 días. A lo largo de los cuales, los gusanos son traspasados periódicamente a placas nuevas con el metabolito fenólico o DMSO y *E. coli* como alimento. Estos ensayos son realizados en condiciones normales de crecimiento (20 °C) y con estrés térmico a 35 °C, 5 h antes de la extracción. La extracción de ARN total se llevó a cabo mediante un Kit comercial de aislamiento RNAspin Mini illustra (G. E. Healthcare Life Sciences). Para esto, los gusanos se recogen de las placas con buffer M9; se realizan dos lavados con el mismo buffer y el pellet se resuspende en 300 µL de M9, 3,5 µL de 2-mercaptoetanol y 350 µL de buffer de lisis. Se añaden 10 bolitas de acero de 10 mm de diámetro y las muestras se someten a 7 ciclos de 10 segundos a una velocidad de 5,5 m/s en un homogenizador FastPrep. Para cuantificar la cantidad de ARN se utiliza un espectofotómetro Nanodrop.

El ADNc es sintetizado a partir de 2 µg del ARN total obtenido de la extracción por medio de la transcripción reversa (RT) con el kit High-Capacity cDNA Reverse Transcription de Applied Biosystems.

Para determinar los niveles de expresión de genes se utiliza una variante de la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) (Mullis et al., 1986). La PCR cuantitativa (RT-qPCR) fue realizada por el Servicio de Secuenciación de ADN de la plataforma Nucleus de la Universidad de Salamanca, con el sistema BioMark™ HD, utilizando EvaGreen como método de detección. Para la cuantificación relativa del producto se determina el ciclo umbral o cycle threshold (Ct) durante la fase exponencial del proceso. La cuantificación lleva a cabo con el método  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  con *act-1* como normalizador (Livak y Schmittgen, 2001). Para el análisis de la expresión de ARNm se realizaron 9 experimentos independientes con los nematodos sin estrés y tres experimentos independientes en los nematodos sometidos a estrés, determinando la curva de disociación para confirmar una única amplificación.

Los cebadores o primers específicos para el ADNc codificante de cada una de las proteínas a estudiar fueron los siguientes:

*act-1*: CCAGGAATTGCTGATCGTATG (F) y GGAGAGGGAAGCGAGGATAG (R) (Surco-Laos et al., 2011).

*daf-16*: CCAGACGGAAGGCTTAAACT (F) y ATTCGCATGAAACGAGAATG (R) (Zhang et al., 2015).

*sir-2.1*: GACAAAGAACAGAAAGTACAACCAG (F) y GGAGTGGCACCATCAT-CAAG (R) (Deusing et al., 2015).

*skn-1*: AGTGTCGGCGTTCCAGATTTT (F) y GTCGACGAATCTTGCGAATCA (R) (Martinez-Finley et al., 2013).

*sod-3*: CGAGCTCGAACCTGTAATCAGCCATG (F) y GGGGTACCGCTGATAT-TCTTCCACTTG (R) (Wei et al., 2017).

*daf-18*: TACGGAACAAGCAATGG (F) y AGTCATCCTTGACGATACCTTT (R) (Ayuda, 2018).

*hsp-16.2*: CTGCAGAATCTCTCCATCTGAGTC (F) y AGATTCTGAAGCAACTG-CACC (R) (Zhang et al., 2015).

*hsf-1*: GAAATGTTTTGCCGCATTTT (F) y CCTTGGGACAGTGGAGTCAT (R) (Kern et al., 2010).

*ctl-1*: AATGGATACGGAGCGCATAC (F) y TCCTGTTCAGCACCATCTTG (R) (Bonomo et al., 2014).

### 3.2.9 Análisis estadísticos

Los análisis estadísticos se realizaron utilizando el paquete de software para PC SPSS (versión 23,0, SPSS Inc., Chicago). Para los ensayos de la supervivencia al estrés térmico, se realizaron tablas de contingencia y se calculó la significación estadística usando el Chi Square Test. Las comparaciones múltiples de valores para determinar posibles diferencias significativas entre los grupos tratados y los grupos control en los ensayos de ROS (DCFH-DA y MitoSOX) y la cuantificación de ARNm mediante qPCR se realizaron con la prueba de ANOVA. Para los estudios de longevidad, la supervivencia del animal se trazó usando las curvas de supervivencia de Kaplan-Meier y se analizaron los resultados mediante la prueba de Log-Rank. En cada análisis, las diferencias con un valor de  $p \leq 0,05$  se consideraron estadísticamente significativas.

### 3.2.10 Preparación de sulfatos de PCA

Se optimizó un procedimiento basado en el método descrito anteriormente en nuestro laboratorio para la hemisíntesis de sulfatos de catequina (González-Manzano et al., 2009). El PCA (500 mg) se disuelve en dioxano (50 mL) y se deja reaccionar con un exceso molar de 10 veces de trióxido de azufre-N-trietilamina. La reacción se lleva a cabo bajo atmósfera de argón en un baño de agua (40 °C) durante 3 h. Los productos de sulfatación precipitan y el sobrenadante se decanta. El precipitado se redisuelve en agua ultrapura y se lleva a sequedad en un evaporador rotatorio. La composición del extracto, que contiene una mezcla de sulfatos, se analiza por HPLC-DAD-MS. Los productos de sulfatación se recuperan en un volumen mínimo de agua ultrapura y se fraccionan mediante HPLC semipreparativa en un equipo Agilent 1260 Infinity LC (Agilent Technologies, Waldbronn, Alemania), compuesto por un inyector automático termostaticado, un sistema binario con dos bombas preparativas acopladas, un detector de diodos y un colector de fracciones termostaticado, controlado por

una estación de tratamiento de datos con el software OpenLab CDS (versión C.01.04). Para la separación se utilizó una columna Agilent Prep-C18, 5  $\mu\text{m}$  (21,2 mm x 150 mm) y como eluyentes (A) ácido trifluoroacético al 0,05 % en agua ultrapura y (B) acetonitrilo, estableciendo el siguiente gradiente de elución: 100 % A durante 30 min, 0-5 % de B 10 min, 5-10 % de B en 20 min, 10-60 % de B en 5 min, con un flujo de 15 mL/min. La detección se realiza a 290 nm. Las fracciones que contienen los monosulfatos se recogen, se concentran en rotavapor, se redisuelven en ácido fórmico al 2 % en agua ultrapura y se cargan en un cartucho de intercambio iónico Oasis MCX 3 cc (60 mg) para eliminar la trimetilamina residual. Los cartuchos se acondicionan previamente con metanol y se equilibran con agua ultrapura, y la muestra se eluye con ácido fórmico al 2 % en agua ultrapura. Para mayor estabilidad, los sulfatos se convierten en sus sales sódicas por reacción con hidróxido de sodio 0,5 M, como se describe en Almeida et al. (2017) y son seguidamente liofilizados. La identidad y la pureza de los sulfatos obtenidos se verifica por RMN como se describe en el apartado 3.2.12.

### **3.2.11 Análisis por HPLC-DAD-MS**

Se realiza en un equipo de HPLC Agilent serie 1200 (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, EE. UU.) provisto de una bomba cuaternaria y un detector de diodos (DAD) y controlado por el software ChemStation (versión B.04.01). Para la separación se utiliza una columna Poroshell 120 EC-C18 de Agilent, 2,7  $\mu\text{m}$  (4,6 mm x 150 mm) termostaticada a 35 °C, utilizando como eluyentes (A) ácido fórmico al 0,1 % en agua ultrapura y (B) acetonitrilo, con el siguiente gradiente de elución: 100 % A durante 10 min, 0-5 % B en 10 min, 5-10 % B en 15 min, 10-14,5 % de B en 20 min y 14,5-60 % de B en 15 min, a una velocidad de flujo de 0,5 mL/min. Se lleva a cabo una detección doble utilizando el espectrofotómetro de diodos y mediante espectrometría de masas (MS), seleccionando 250 y 290 nm como longitudes de onda preferidas para el registro del cromatograma. La detección de MS se realiza en un espectrómetro API 3200 Qtrap (Applied Biosystems, Darmstadt, Alemania) equipado con una sonda de ionización por electrospray (ESI) y un analizador de masas de triple cuadrupolo que también puede actuar como trampa de iones, controlado por el software



Analyst 5.1. Los espectros de masas se registran en modo negativo entre  $m/z$  100 y 900. Se utiliza aire cero a 50 psi como nebulizador y como turbo gas a 500 °C y 40 psi para la eliminación del eluyente, y nitrógeno a 25 psi como gas cortina. La adquisición de datos se realiza en modo *full scan* de alta sensibilidad (*Enhanced MS*, EMS), seguida de análisis en modo *Enhanced Product Ion* (EPI) para obtener la fragmentación característica de los iones mayoritarios obtenidos en el primer registro. Como parámetros EMS se utilizan: voltaje del capilar, -3500 V; *declustering potential* (DP), -65 V; potencial de entrada (EP), -10 V y energía de colisión (CE), -20 V; y como condiciones EPI: DP, -40 V; EP, -8 V; CE, -50 V, y energía de colisión (CES), 20 V.

### 3.2.12 Análisis por RMN

Los espectros de  $^1\text{H}$ -RMN (400 MHz) y  $^{13}\text{C}$ -RMN (100 MHz) de los metabolitos preparados se midieron en DMSO deuterado en un espectrómetro Bruker Avance DRX-400 a 298 K. Como referencias internas se utilizaron las resonancias residuales para el DMSO deuterado a 2,50 ppm en el espectro  $^1\text{H}$  y a 39,79 ppm en el espectro  $^{13}\text{C}$ . Los desplazamientos químicos de  $^1\text{H}$  se asignaron usando  $^1\text{H}$ -NMR unidimensional (1D) y bidimensional (2D) [espectroscopia de correlación (COSY)], mientras que las resonancias  $^{13}\text{C}$  se asignaron utilizando 2D-NMR mediante HMBC (correlación heteronuclear de enlaces múltiples) y HSQC (correlación heteronuclear cuántica simple).



*IV. RESULTADOS  
Y DISCUSIÓN*



#### 4.1 Ensayos de optimización del método de análisis de superóxido en *C. elegans* mediante el reactivo MitoSOX

El aumento en la producción de superóxido celular se ha implicado en enfermedades crónicas y neurodegenerativas. Este radical se genera como un subproducto de la fosforilación oxidativa, ya que durante la transferencia de electrones en la cadena mitocondrial de transporte de electrones una pequeña fracción de electrones desapareados reacciona inevitablemente con el oxígeno molecular para formar el radical anión superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ) (Turrens, 1997).

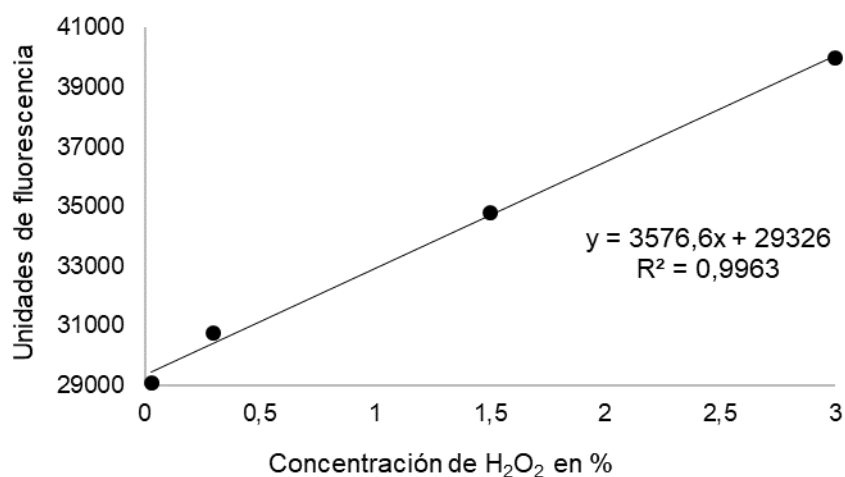
Para la determinación de superóxido en *C. elegans* se optimizó un procedimiento utilizando el reactivo “MitoSOX™ Red mitochondrial superoxide indicator” de Invitrogen. Este reactivo es una molécula de dihidroetidio (DHE) que al ser oxidada por  $O_2^{\cdot-}$  da lugar a la formación de etidio, que es un compuesto fluorescente (Labuschagne y Brenkman, 2013). Para su empleo, el MitoSOX se preparó añadiendo 13  $\mu$ L de DMSO al vial del reactivo (50  $\mu$ g) a temperatura ambiente y siempre protegiéndolo de la luz, para obtener una concentración final de 5 mM, como indicaba el fabricante.

Inicialmente, se probó la fluorescencia del MitoSOX en el lector de microplacas, utilizando las longitudes de onda de excitación y emisión 510 y 580 nm, respectivamente, y se realizó una recta de calibrado con diferentes concentraciones de peróxido de hidrogeno, ya que la descomposición de este compuesto genera  $O_2^{\cdot-}$  (Hayyan et al., 2016) y, en nuestro conocimiento, no existe un patrón de  $O_2^{\cdot-}$ . En la microplaca se colocaron 100  $\mu$ L de distintas concentraciones de  $H_2O_2$  disuelto en agua (0,03 %, 0,3 %, 1,5 % y 3 %, v/v) y 50  $\mu$ L del reactivo MitoSOX 5  $\mu$ M, disuelto en PBS. En la Tabla IV.1.1 se recogen los valores de fluorescencia obtenidos. Como se puede observar (Figura IV.1.1), la relación entre la intensidad de fluorescencia y las concentraciones de peróxido de hidrógeno ( $R^2 = 0,9963$ ), en el intervalo ensayado, era lineal y se obtenía también una buena reproducibilidad en la respuesta.

**Tabla IV.1.1** Valores de fluorescencia ( $\lambda_{exc}$  510 nm,  $\lambda_{em}$  580 nm) obtenidos para distintas concentraciones de peróxido de hidrógeno.

Concentración de $H_2O_2$ (%)	Unidades de fluorescencia
0,03	29075 $\pm$ 1131
0,3	30744 $\pm$ 1622
1,5	34779 $\pm$ 966
3	39981 $\pm$ 755

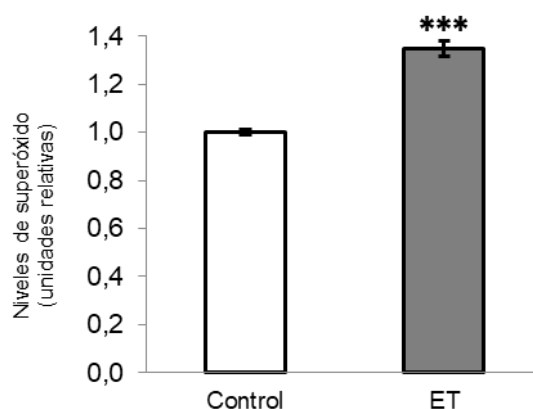
\*Los valores de fluorescencia son el promedio de 3 repeticiones  $\pm$  SD.



**Figura IV.1.1.** Comprobación de la relación de linealidad entre concentraciones de peróxido de hidrógeno y unidades de fluorescencia.

La puesta a punto del protocolo de trabajo para la determinación de superóxido en *C. elegans* con MitoSOX se realizó partiendo del trabajo de Qabazard et al. (2014), con algunas modificaciones. Inicialmente se comprobó que la concentración de reactivo empleada (5  $\mu$ M) permitía la lectura de la fluorescencia con los volúmenes utilizados para la medida en el lector de microplacas. Como condiciones de trabajo se utilizaron las mismas que para la determinación de ROS por el método de la fluoresceína (ver apartado 3.2.7.1 de la sección de Materiales y métodos), modificando los tiempos de reacción en la microplaca de acuerdo con lo indicado por el fabricante.

Partiendo de la premisa de que la exposición del gusano a estrés térmico genera ROS (Abele et al., 2002; Heise et al., 2003), como anteriormente se había podido confirmar en estudios realizados en el laboratorio (González-Manzano et al., 2012), para comprobar el correcto funcionamiento del reactivo se realizaron ensayos en nematodos control y tratados con estrés térmico (ET). Para ello, gusanos en el segundo día de adulto se transfirieron manualmente a una placa de 96 pocillos, colocando un nematodo por pocillo, junto con 100  $\mu$ L de PBS, y fueron seguidamente sometidos a estrés térmico (2 h a 35 °C). Tras la aplicación del estrés, se colocaron en las placas, también de manera individual, gusanos del mismo cultivo no sometidos a estrés, como control. A continuación, se añadieron 50  $\mu$ L del reactivo MitoSOX (5  $\mu$ M en PBS) en cada pocillo y se procedió a la medida de la fluorescencia en un lector de microplacas cada 10 min, durante 40 min a 35 °C. Se realizaron 3 ensayos independientes, y en cada ensayo las medidas se realizaron en al menos 16 individuos de cada grupo. En la Figura IV.1.2 se recogen los resultados obtenidos en estos ensayos, expresados como valores relativos, normalizados con relación a los respectivos controles. Como se puede observar, se encontraron diferencias significativas ( $p < 0,001$ ) entre gusanos control y gusanos sometidos a estrés térmico, los cuales presentaban, por término medio, niveles relativos de superóxido un 35 % más elevados que los controles.



**Figura IV.1.2** Niveles relativos de superóxido en *C. elegans* determinados en el segundo día de adulto, en gusanos control y gusanos sometidos a estrés térmico (ET) a 35 °C durante 2 h. En cada caso se realizaron tres experimentos independientes sobre al menos 16 individuos. Los resultados representan la media  $\pm$  SEM. La significación estadística se calculó mediante ANOVA de un factor (\*\*\*)  $p < 0,001$ ).

## 4.2 Estudios con ácido protocatéutico

El ácido protocatéutico (ácido 3,4-dihidroxibenzoico, PCA) es un ácido fenólico tipo catecol (*o*-difeno) (Figura IV.2.1) presente en productos vegetales como metabolito secundario producido a través de la vía del ácido shikímico (Kakkar y Bais, 2014). Debido a las bajas concentraciones en que es encontrado de manera natural en frutas y hortalizas apenas se ha prestado atención a sus efectos en salud humana. Hoy se sabe que la concentración de PCA que puede alcanzarse *in vivo* es mayor que la que derivaría de la simple cantidad ingerida, ya que es un producto principal del metabolismo de compuestos fenólicos en el organismo humano y, particularmente, de flavonoides como flavonoles, antocianos o procianidinas (Masella et al., 2012). En estudios modelo, principalmente *in vitro*, se ha demostrado que el PCA tiene actividad antioxidante, antibacteriana, antiinflamatoria, cardiovascular o anticancerígena (Kakkar y Bais, 2014; Khan et al., 2015).

En este trabajo se evaluó el efecto biológico de PCA en la resistencia frente a estrés oxidativo inducido térmicamente, niveles de ROS y longevidad en *C. elegans*.

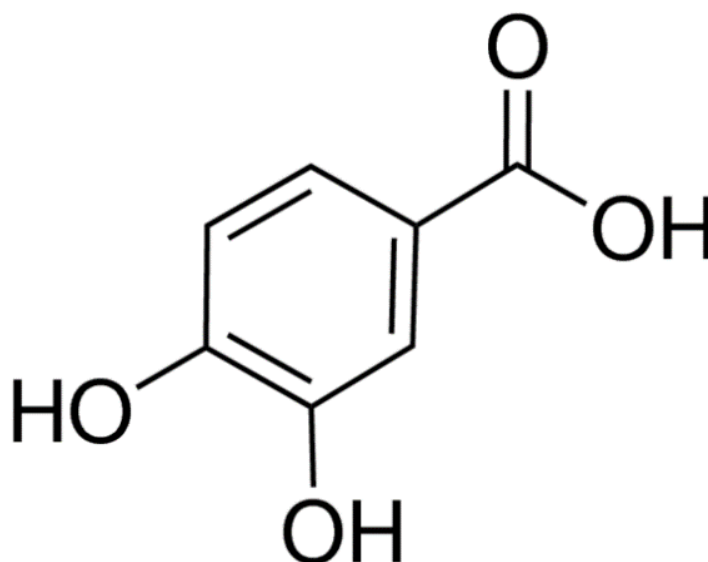


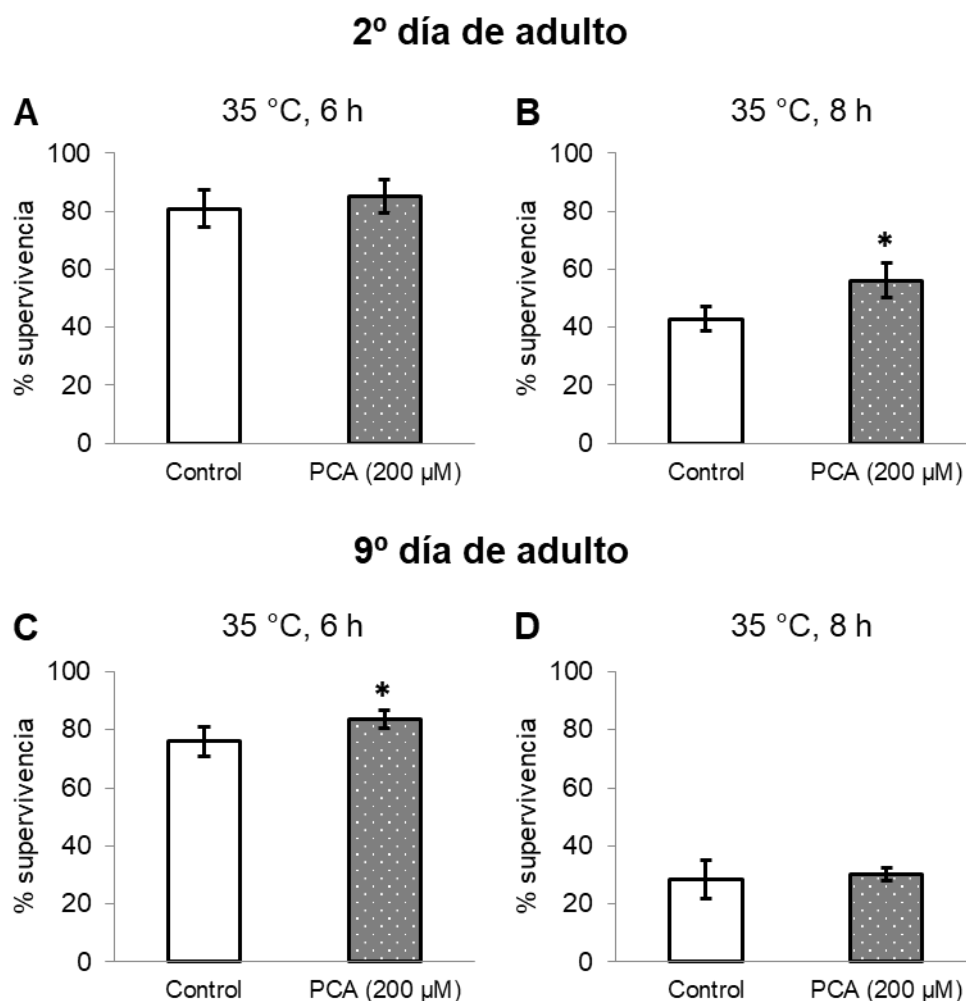
Figura IV.2.1. Estructura del ácido protocatéutico.



#### 4.2.1 Ensayos de estrés térmico

Está bien establecido que las altas temperaturas ambientales causan en *C. elegans* daños estructurales y funcionales, que podrían estar relacionados con la acumulación de ROS y subsecuente inducción de estrés oxidativo (Abele et al., 2002; Heise et al., 2003; Kampkötter et al., 2007b; González-Manzano et al., 2012). Con el objetivo de comprobar si los gusanos previamente tratados con PCA mejoraban su resistencia frente al estrés oxidativo provocado térmicamente, individuos de la cepa silvestre N2 de *C. elegans* se cultivaron en medio NGM que contenía PCA (200 o 300  $\mu\text{M}$ ) desde que entraban en la fase larvaria L1 hasta el día de aplicación del estrés térmico. En el segundo y noveno día de adulto, correspondientes a un adulto joven en etapa reproductiva y un adulto envejecido, los gusanos se sometían a una temperatura de 35 °C utilizando dos tiempos de tratamiento diferentes (6 y 8 h), para después comparar su tasa de supervivencia con la de una población control de nematodos sometida a las mismas condiciones de estrés, pero cultivada en ausencia del compuesto.

La Figura IV.2.2 muestra los porcentajes de supervivencia de los nematodos tratados con PCA (200  $\mu\text{M}$ ) tras ser sometidos a estrés en los días 2 y 9 de adulto. En todos los casos, la exposición previa a PCA aumentó el porcentaje de supervivencia de *C. elegans* con respecto al grupo control, siendo significativo ( $p < 0,05$ ) en el segundo día de adulto para un tratamiento térmico de 8 h (Figura IV.2.2, B), donde el porcentaje de supervivencia pasó de un 43 % en gusanos control a un 56 % en los que había sido cultivados en presencia de PCA, y en el noveno día de adulto para 6 h de estrés (Figura IV.2.2, C), donde se observó un 76 % de tasa de supervivencia en los nematodos control y un 84 % en el grupo de PCA.



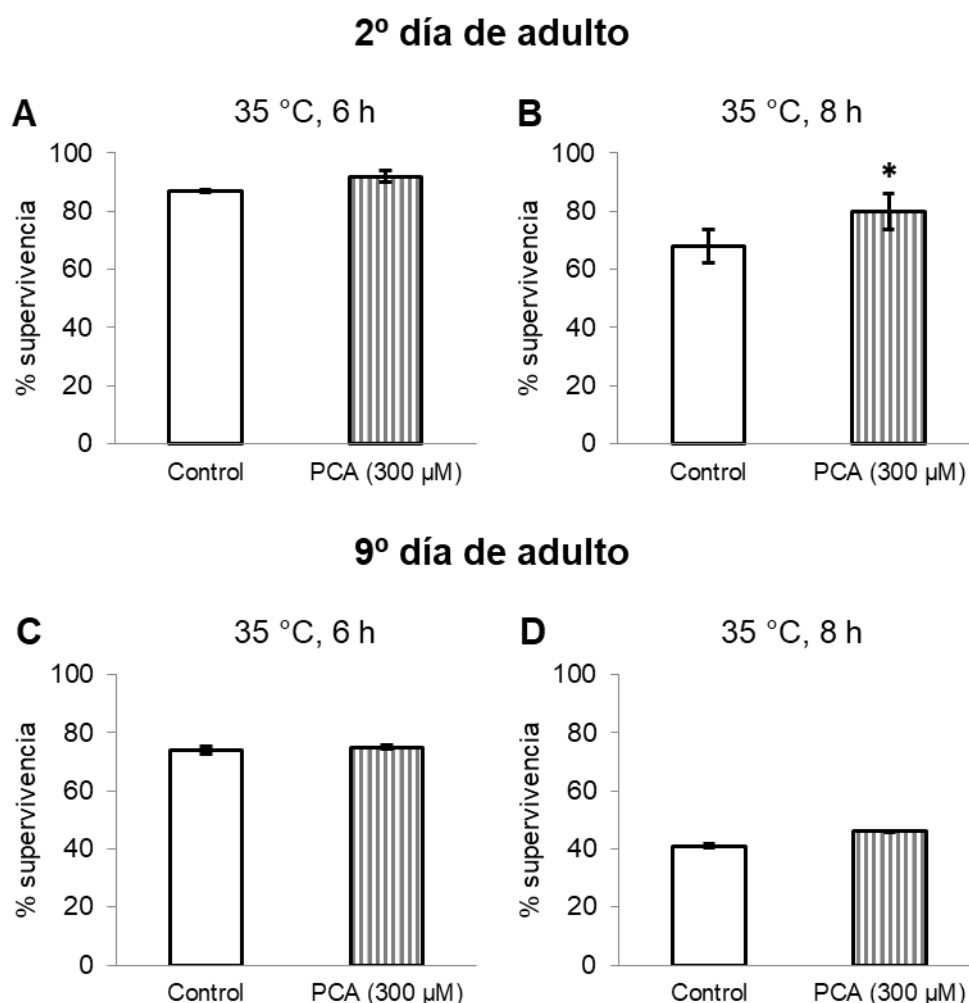
**Figura IV.2.2.** Porcentajes de supervivencia de *C. elegans* sometidos a estrés térmico (35 °C) durante 6 h (A y C) u 8 h (B y D) en el segundo y noveno día de adulto, cultivados en ausencia (controles) o presencia de PCA (200 µM). En cada caso se realizaron tres experimentos independientes (300 gusanos por grupo). Los resultados representan la media  $\pm$  SEM. La significación estadística se calculó usando la prueba Chi Cuadrado (\* $p < 0,05$ ).

Los resultados obtenidos están de acuerdo con los observados por Kim et al. (2014) en estudios realizados con *C. elegans* cultivado en presencia de PCA (100 y 200 µM) extraído de *Veronica peregrine*. Estos autores encontraron que el tratamiento con PCA aumentaba, de manera dependiente de la concentración, la resistencia del nematodo frente al estrés oxidativo inducido en el día 4 de adulto térmicamente (36 °C) o con paraquat. Estudios con otros compuestos fenólicos también ofrecieron resultados similares. Piestch et al. (2009) encontraron que el tratamiento con quercetina (200 µM) mejoraba la termotolerancia de los nematodos sometidos a estrés (35 °C, 8 h) en el día 6 de

adulto, aumentando la tasa de supervivencia un 10 % respecto al control. También se describió una mejora de la resistencia al estrés térmico por otros flavonoles como kaempferol, fisetina o quercetina 3-O-rutinósido (Kampkötter et al., 2007a,b, 2008). Asimismo, en trabajos previos de nuestro grupo (Surco-Laos et al., 2011) se demostró que el tratamiento con quercetina, tamarixetina o isoramnetina aumentaba significativamente la supervivencia de *C. elegans* alrededor de un 35 % cuando era sometido a estrés térmico (35 °C, 8 h) el día 6 de adulto. Wu et al. (2002) encontraron que el tratamiento con un extracto de *Ginkgo biloba* rico en flavonoides inducía una mejora en la resistencia al estrés térmico, aumentando la supervivencia alrededor de un 25 %, y al estrés oxidativo provocado con juglona de un 33 %, respecto al grupo control. Igualmente, estudios con extractos vegetales ricos en proantocianidinas o antocianos también han conducido a resultados similares, observando aumentos en la tasa de supervivencia de *C. elegans* frente al estrés oxidativo inducido térmica o químicamente (juglona) (Wilson et al., 2006, Peixoto et al., 2016).

El empleo 200 µM de PCA para la realización de los ensayos se había elegido basándose en estudios previos realizados en el laboratorio con flavonoles (Surco-Laos et al., 2011), ya que esta concentración era la que ofrecía los resultados más favorables en cuanto a mejora de longevidad y resistencia a estrés oxidativo. Sin embargo, en estudios con catequinas, se observó que *C. elegans* incorporaba estos compuestos de manera dosis-dependiente en el intervalo de concentraciones entre 50, 100, 200 y 400 µM (Surco-Laos et al., 2012), y en un trabajo posterior con quercetina-3, O-glucósido se comprobó que la mayor captación y acumulación de compuesto en el organismo del gusano que se producía al aumentar su concentración en el medio conducía a una menor duración de vida a partir de determinados niveles (en ese caso > 50 µM) (Dueñas et al., 2013). Por otra parte, Pietsch et al. (2011) encontraron resultados favorables en cuanto a aumento de longevidad con el tratamiento de *C. elegans* con ácido cafeico y ácido rosmarínico únicamente para concentraciones superiores a 200 µM. De este modo, parecía conveniente ensayar si el empleo de una mayor concentración de PCA en el medio mejoraba o no sus efectos sobre el gusano. Por esta razón, se programaron ensayos similares a los anteriores utilizando una concentración de PCA de 300 µM.

En la Figura IV.2.3 se recogen los resultados obtenidos en el ensayo de estrés térmico de los gusanos tratados con PCA 300  $\mu\text{M}$ , donde se puede observar que, al igual que en el tratamiento con PCA 200  $\mu\text{M}$ , se producía un aumento en la tasa de supervivencia de los nematodos tras ser sometidos a estrés térmico (35  $^{\circ}\text{C}$ ), respecto al control. Sin embargo, esta diferencia fue significativa ( $p < 0,05$ ) solamente en el ensayo realizado en el día 2 de adulto para un estrés de 8 h (Figura IV.2.3, B).



**Figura IV.2.3.** Porcentajes de supervivencia de *C. elegans* sometidos a estrés térmico (35  $^{\circ}\text{C}$ ) durante 6 h (A y C) u 8 h (B y D) en el segundo y noveno día de adulto, cultivados en ausencia (controles) o presencia de PCA (300  $\mu\text{M}$ ). En cada caso se realizaron tres experimentos independientes (300 gusanos por grupo). Los resultados representan la media  $\pm$  SEM. La significación estadística se calculó usando la prueba Chi Cuadrado (\* $p < 0,05$ ).

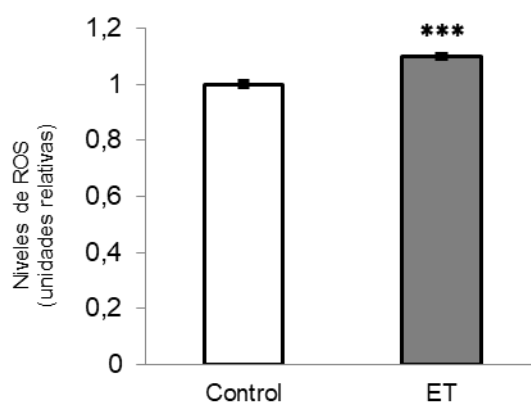
La observación de que la concentración de PCA 300  $\mu\text{M}$  confiere menor protección frente al estrés que 200  $\mu\text{M}$  podría sugerir la existencia de una respuesta hormética. Este tipo de respuesta se caracteriza por una relación dosis-respuesta bifásica, presentando efectos favorables a dosis bajas y perjudiciales a dosis altas (Calabrese y Baldwin, 2002). Aunque en este caso no se llegan a observar efectos indeseables, se trata de un tipo de comportamiento que ha sido descrito en *C. elegans* tratado con extractos fenólicos del té (Xiong et al., 2014), flavonoides aislados (Pietsch et al., 2011; Surco-Laos et al., 2012; Dueñas et al., 2013), y ácidos fenólicos como cafeico, rosmarínico, elágico o tánico (Pietsch et al., 2011; Saul et al., 2011). Pietsch et al. (2011) encontraron que el efecto de quercetina, ácido cafeico y ácido rosmarínico sobre la longevidad de *C. elegans* dependía de la concentración. Estos tres compuestos fenólicos mostraban una relación dosis-respuesta en forma de U invertida para el intervalo entre 50 y 600  $\mu\text{M}$ , induciendo una mayor duración de vida a concentraciones entre 100 y 300  $\mu\text{M}$ , mientras que concentraciones inferiores o superiores resultaban en una reducción en la duración de la vida del nematodo. Igualmente, en estudios realizados en nuestro laboratorio se encontró que el tratamiento con quercetina-3-O-glucósido aumentaba la duración de la vida de *C. elegans* a bajas concentraciones (10-25  $\mu\text{M}$ ), mientras que la exposición a dosis mayores (50-200  $\mu\text{M}$ ) producía una reducción dosis-dependiente en la duración de vida (Dueñas et al., 2013). En nuestro conocimiento, no se han realizado estudios en *C. elegans* utilizando concentraciones más elevadas de PCA, que permitan concluir sobre la posibilidad de una respuesta hormética, pero en ensayos realizados en ratones, se han encontrado efectos perjudiciales para PCA administrado intraperitonealmente en concentraciones altas (500 mg/kg), dando lugar a agotamiento de glutatión (GSH) y producción de daños en hígado, riñón y piel (Nakamura et al., 2001).

#### 4.2.2 Determinación de niveles intracelulares de ROS

El 2',7'-diclorodihidrofluoresceína diacetato (DCFH-DA) es un éster permeable que atraviesa las membranas celulares y es hidrolizado enzimáticamente por esterasas que eliminan los grupos acetatos liberando diclorodihidrofluoresceína (DCFH), un compuesto no fluorescente (Wang y

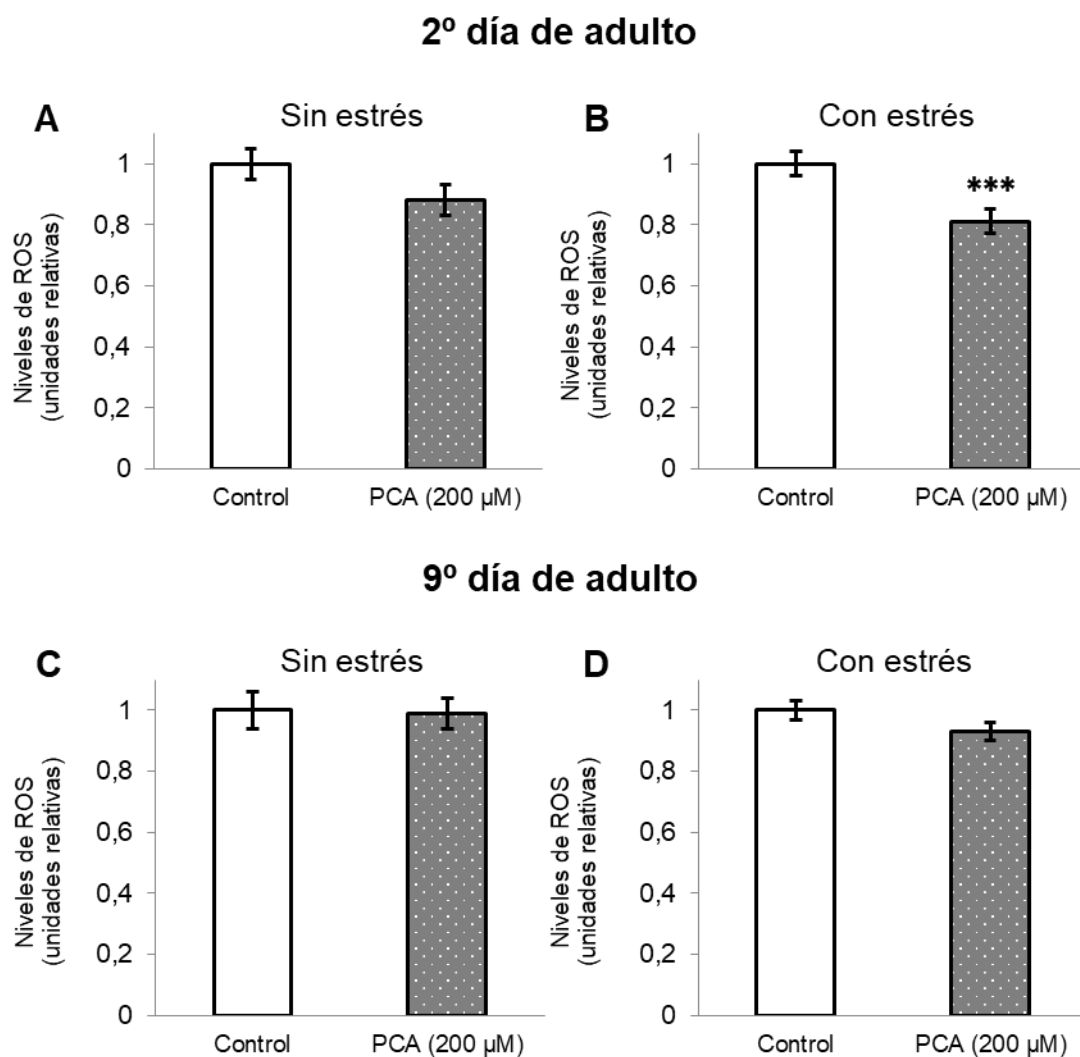
Joseph, 1999). En presencia de ROS el DCFH es oxidado a un compuesto fluorescente (diclorofluoresceína, DCF). Esta reacción es empleada para detectar en sistemas biológicos diversos ROS a los que el DCFH-DA es sensible, como ONOO<sup>-</sup>, <sup>•</sup>OH y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en presencia de peroxidasas. Por lo tanto, la medida de DCF intracelular puede ser utilizada como un índice de los niveles intracelulares de ROS (Myhre et al., 2003). Existe, no obstante, controversia sobre la utilización de este reactivo por su falta de especificidad, al no reaccionar con todos los tipos de ROS, no permitir la localización subcelular y la posible existencia de artefactos (Dikalov y Harrison, 2014). A pesar de ello, se trata de un reactivo ampliamente utilizado para el estudio del estado oxidativo en sistemas celulares y biológicos, como marcador para evaluar la producción de ROS totales (Chen et al., 2010; Labuschagne y Brenkman, 2013; Pavelescu, 2015).

Como se mencionó anteriormente, el efecto tóxico del estrés térmico se asocia con daño causado por la acumulación de ROS y, en consecuencia, producción de estrés oxidativo (Abele et al., 2002; Heise et al., 2003; Kampkötter et al., 2007b). La existencia de un aumento en los niveles de ROS como respuesta al estrés térmico en *C. elegans* ha sido, de hecho, comprobada en estudios previos de nuestro grupo (González-Manzano et al., 2012), empleando el método de la diclorofluoresceína, descrito en el apartado 3.2.7.1. Esto se confirmó en el presente trabajo, donde se realizaron ensayos con gusanos sometidos a estrés térmico (2 h a 35 °C) en el segundo día de adulto, comprobando que se producía un aumento significativo ( $p < 0,001$ ) en los niveles intracelulares de ROS del 10 % respecto al grupo control no sometido a estrés (Figura IV.2.4). Se debe indicar que los resultados presentados en la gráfica de Figura IV.2.4 no corresponden a valores absolutos de fluorescencia, sino que los datos están normalizados con relación a los respectivos controles. En concordancia con nuestros resultados, Kampkötter et al. (2007b) también encontraron un aumento en la acumulación intracelular de ROS en *C. elegans* sometido a estrés térmico (37 °C) de manera dependiente del tiempo.



**Figura IV.2.4.** Niveles intracelulares relativos de ROS, determinados con DCFH-DA, en *C. elegans* en el segundo día de adulto, en gusanos control y gusanos sometidos a estrés térmico (ET) a 35 °C durante 2 h. En cada caso se realizaron tres experimentos independientes. Los resultados están normalizados respecto al control y representan la media  $\pm$  SEM. La significación estadística se calculó mediante ANOVA de un factor (\*\*\*)  $p < 0,001$ ).

Una vez establecido que el tratamiento térmico inducía un aumento en la concentración de ROS, se procedió a estudiar si el tratamiento con PCA era capaz de influir sobre este proceso. Para ello, se determinaron los niveles intracelulares de ROS en nematodos cultivados en presencia de PCA (200  $\mu$ M y 300  $\mu$ M) y posteriormente sometidos o no a estrés térmico (35 °C, 2 h) en el segundo y noveno día de adulto. Como se muestra en la Figura IV.2.5, se observó que en los ensayos realizados el día 2 de adulto, el tratamiento con PCA (200  $\mu$ M) provocaba una disminución de los niveles de ROS en los gusanos tratados respecto al grupo control (Figura IV.2.5, A y B), que era significativa ( $p < 0,001$ ) en el grupo sometido a estrés térmico, con una disminución del 19 % en los niveles de ROS. Los ensayos realizados el día 9 de adulto también mostraron una disminución en los niveles de ROS en los animales tratados previamente con PCA (200  $\mu$ M), respecto al control, aunque las diferencias no eran significativas en ningún caso (Figura IV.2.5, C y D).

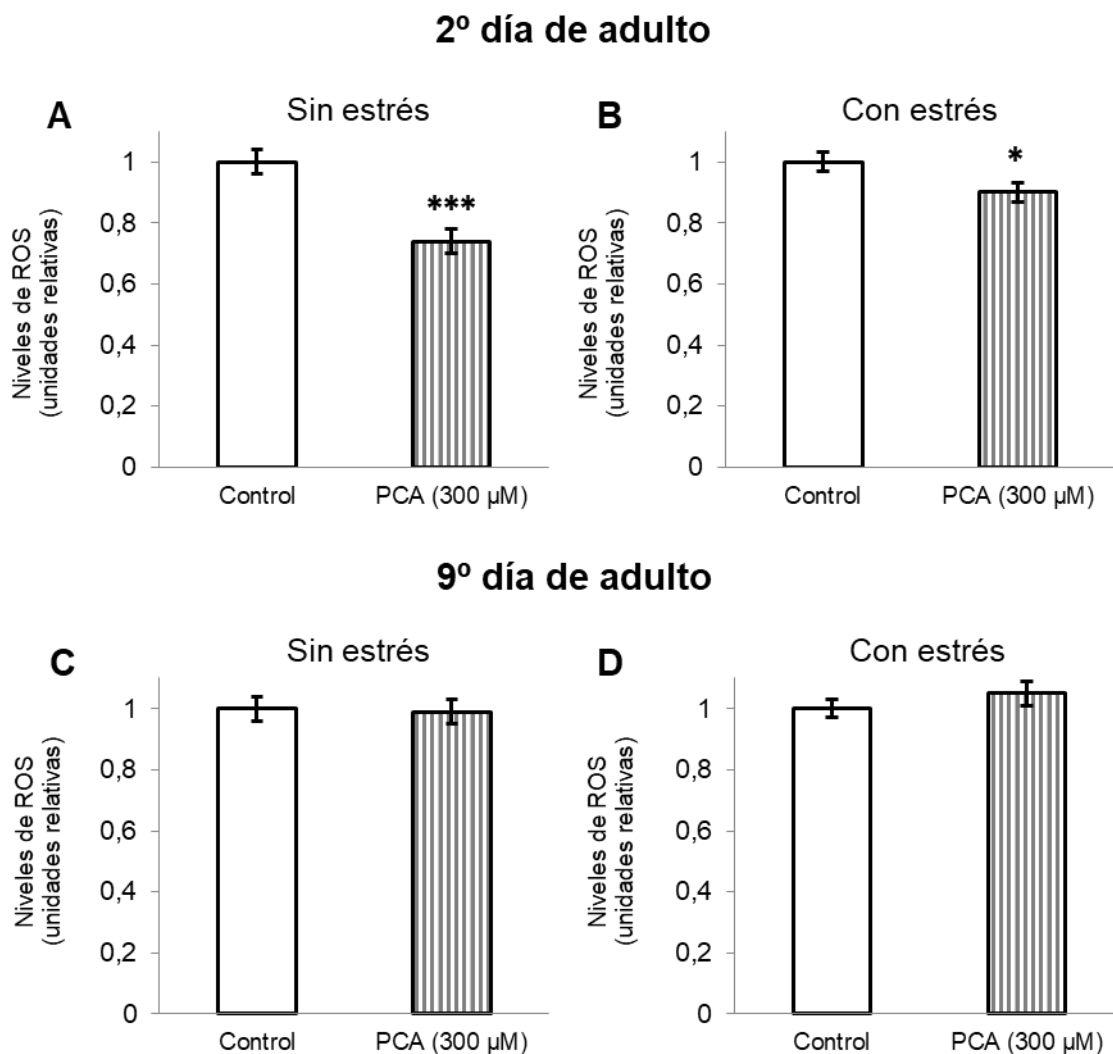


**Figura IV.2.5.** Niveles intracelulares relativos de ROS, determinados con DCFH-DA, en *C. elegans* en los días 2 y 9 de adulto, cultivados en presencia o ausencia de PCA (200 µM), no sometidos (A y C) y sometidos a estrés térmico (B y D). En cada caso se realizaron tres experimentos independientes. Los resultados están normalizados respecto al control y representan la media  $\pm$  SEM. La significación estadística se calculó mediante ANOVA de un factor (\*\*\*)  $p < 0,001$ .

En los ensayos con PCA 300 µM se observó que el tratamiento con el compuesto a esa concentración disminuía significativamente los niveles de ROS con respecto al control en el segundo día de adulto, tanto en gusanos sometidos (10 %,  $p < 0,05$ ) como no sometidos (26 %,  $p < 0,001$ ) a estrés térmico (Figura IV.2.6, A y B). Para el día 9 de adulto no se encontraron diferencias significativas (Figura IV.2.6, C y D).



Resultados similares fueron obtenidos por Kim et al. (2014) en ensayos con *C. elegans* sometido a estrés oxidativo con paraquat, donde observaron una disminución significativa en la acumulación de ROS en el grupo tratado con PCA (100 y 200  $\mu\text{M}$ ), en su caso de una manera dependiente de la concentración. Igualmente, se ha descrito una reducción de los niveles intracelulares de ROS, tanto en condiciones normales como en condiciones de estrés térmico, en gusanos tratados con flavonoles (Kampkötter et al., 2007a,b; Grünz et al., 2012; Delgado-Ciruelos, 2015) o extractos vegetales ricos en antocianos (Peixoto et al., 2016).



**Figura IV.2.6.** Niveles intracelulares relativos de ROS, determinados con DCFH-DA, en *C. elegans* en los días 2 y 9 de adulto, cultivados en presencia o ausencia de PCA (300  $\mu\text{M}$ ), no sometidos (A y C) y sometidos a estrés térmico (B y D). En cada caso se realizaron tres experimentos independientes. Los resultados están normalizados respecto al control y representan la media  $\pm$  SEM. La significación estadística se calculó mediante ANOVA de un factor (\* $p < 0,05$  y \*\*\* $p < 0,001$ ).

El nivel de ROS en un organismo es el resultado del balance entre las ROS producidas y las que son eliminadas mediante los diferentes sistemas de detoxificación. Como ya se ha mencionado en la introducción bibliográfica, además de un posible efecto antioxidante directo, es decir una capacidad reductora y captadora de radicales libres, se ha sugerido que los compuestos fenólicos son capaces de modular la actividad de las defensas antioxidantes endógenas (Procházková et al., 2011).

La capacidad del PCA para activar las defensas antioxidantes endógenas ha sido puesta de manifiesto en distintos estudios en líneas celulares. An et al. (2006) comprobaron que el tratamiento con PCA extraído de *Alpinia oxyphylla* actuaba de manera dosis-dependiente sobre el sistema antioxidante endógeno en la línea PC12 de feocromocitoma de rata, aumentando la actividad de GPx, CAT y SOD-3 reduciendo así el daño peroxidativo lipídico. En diferentes modelos celulares también se ha demostrado que el tratamiento con PCA aumentaba los niveles basales de GSH y prevenía su oxidación por LDL oxidadas (Masella et al., 2004; Giovannini et al., 2008). Estos resultados se atribuyeron a la preservación de GSH, debido a la actividad antioxidante del PCA, que sustituiría al GSH en la captación de radicales, así como a la capacidad del PCA para fortalecer el ciclo del glutatión. En este sentido, se demostró que el PCA podía modular la transcripción y la actividad de enzimas como GPx y glutatión reductasa (GR) en una línea celular de macrófagos murinos (Masella et al., 2004). Por su parte, Kim et al. (2014) observaron que el tratamiento con PCA incrementaba la actividad de las enzimas antioxidantes CAT y SOD-3 en *C. elegans*, siendo significativo a la concentración de 200  $\mu$ M.

Como se ha descrito anteriormente, Nrf2 es un factor de transcripción que regula la expresión de genes de enzimas detoxificantes de fase II y proteínas antioxidantes, como CAT, SOD, GPx, GST, NQO-1 o GSH (Nguyen et al., 2009; Chen, J. et al., 2014). En un estudio con una línea celular de macrófagos se encontró que el PCA era capaz de inducir el aumento en la expresión del ARNm de Nrf2 y su traslocación al núcleo, que permite que el factor de transcripción se una a las secuencias ARE específicas presentes en los promotores de enzimas antioxidantes endógenas (Vari et al., 2011).

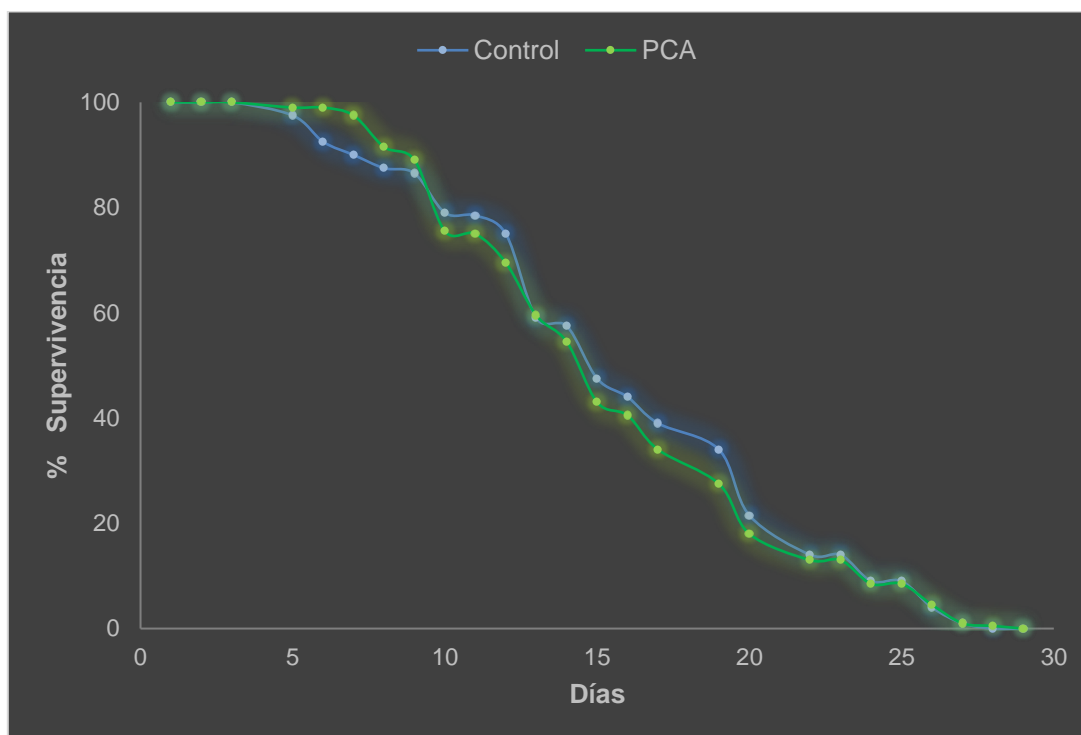
En estudios *in vitro* se ha demostrado actividad antioxidante para PCA (Sroka y Cisowski, 2003; Li et al., 2011; Tang et al., 2016), que se ha relacionado con su estructura tipo catecol. En modelos celulares también se ha encontrado que el PCA es efectivo para contrarrestar la lipoperoxidación y el estrés oxidativo (Guan et al., 2006; Shi et al., 2006; Tarozzi et al., 2007; Giovannini et al., 2008; Guan et al., 2009; Hsu et al., 2009; Chou et al., 2010b; Vari et al., 2011).

Teniendo en cuenta estos antecedentes, la atenuación de los niveles intracelulares de ROS y el aumento de la termotolerancia provocados por el tratamiento de PCA en *C. elegans* observados en el presente trabajo se podrían atribuir, al menos en parte, a su capacidad antioxidante y a una posible influencia en la regulación de la actividad de moléculas antioxidantes endógenas. No obstante, esta explicación es meramente especulativa y sería necesario profundizar más en los mecanismos moleculares finalmente implicados en los efectos protectores del PCA frente al estrés oxidativo.

#### 4.2.3 Ensayos de longevidad

La resistencia al estrés se considera que está estrechamente relacionada con la longevidad, ya que muchas cepas de animales de mayor duración de vida son más resistentes a diferentes tipos de estrés, incluido el calor, radiación o daño oxidativo. Genes relacionados con la resistencia al estrés se han utilizado para identificar mutantes longevos. En *C. elegans* aproximadamente el 80 % de los genes que promueven la termotolerancia también se relaciona con el aumento en la duración de vida (Zevian y Yanowitz, 2014). Por ello, se procedió también a realizar estudios de longevidad en *C. elegans* tratado con PCA. Estos ensayos se llevaron a cabo utilizando una concentración de 200  $\mu\text{M}$ , a la que se habían obtenido los resultados más favorables en los estudios de estrés. Se partió de gusanos sincronizados transferidos en estado larvario L1 a placas suplementadas con PCA (200  $\mu\text{M}$ ), donde se mantenían hasta alcanzar el estado larvario L4 para, a continuación, ser transferidos a placas nuevas también con el compuesto fenólico, momento a partir del cual se comenzaba el recuento de gusanos supervivientes. La Figura IV.2.7 muestra las curvas de supervivencia de los gusanos tratados con PCA y gusanos control (sin tratamiento) y en la Tabla VI.2.1 se recogen los datos de vida media y máxima. Se puede comprobar

que el tratamiento con PCA no condujo a diferencias significativas en los tiempos de vida media y máxima de *C. elegans* con relación a la población control.



**Figura IV.2.7.** Curvas de supervivencia de *C. elegans* cultivados a 20 °C en ausencia (control) y presencia de PCA (200  $\mu$ M).

**Tabla IV.2.1.** Influencia de PCA (200  $\mu$ M) sobre la duración media y máxima de vida de *C. elegans* en condiciones normales de crecimiento a 20 °C. Los resultados representan la media  $\pm$  SEM (n = 3).

Tratamiento	Vida media (días)	$p$ vs. Control (Log-Rank)	Vida máxima 10 % (días)*	$p$ vs. Control (ANOVA)
Control	17,1 $\pm$ 0,40		23,65 $\pm$ 0,90	
PCA (200 $\mu$ M)	16,4 $\pm$ 0,40	0,358	24,35 $\pm$ 0,80	0,541

\* Tiempo promedio de vida máximo del 10 % de la población más longeva.

El efecto del PCA sobre la longevidad en *C. elegans* también fue estudiado por Kim et al. (2014). A diferencia de nuestros resultados, estos autores observaron un aumento significativo ( $p < 0,001$ ) en la vida media que era

dependiente de la concentración (100 y 200  $\mu\text{M}$ ). No obstante, resultados similares a los obtenidos en nuestro estudio han sido descritos para otros compuestos fenólicos, para los que también se encontraba una capacidad para mejorar la resistencia de *C. elegans* frente a estrés oxidativo, sin que ello tuviera relación con la duración de vida del gusano. Así, Peixoto et al. (2016) describen un efecto de protección frente a estrés oxidativo y una disminución de los niveles de ROS inducidos por el tratamiento de *C. elegans* con un extracto rico en antocianos sin apreciar un aumento en la duración de vida. Por su parte, Zhang et al. (2009) tampoco encontraron que epigallocatequina-3-O-galato (EGCG) prolongara la vida media de *C. elegans* en condiciones normales de cultivo, pero si observaron que era capaz de mejorar la resistencia frente a estrés térmico y estrés oxidativo, lo que se relacionó por la capacidad de captación de radicales libres por la EGCG y posiblemente por su influencia sobre la regulación de la expresión del factor de transcripción SKN-1/Nrf-2 y de proteínas relacionadas con resistencia al estrés, como SOD-3 y HSP-16.2. En un estudio previo de nuestro grupo también se encontró que el tratamiento de *C. elegans* con catequina y epicatequina mejoraba la tolerancia al estrés térmico y al estrés oxidativo inducido químicamente con juglona, sin aumentar la vida media de los gusanos, aunque el tratamiento con epicatequina sí conducía a un aumento significativo de la vida máxima (Surco-Laos et al., 2012). Posteriormente, Ayuda-Durán et al. (2019) describieron que la epicatequina era capaz de regular la ruta de señalización de la insulina/IGF-1, modulando la actividad de los factores de transcripción DAF-16, HSF-1 y SKN-1, influyendo, de este modo, sobre la expresión de genes que actúan en la respuesta al estrés y la duración de la vida.

#### **4.2.4 Conclusiones parciales**

De manera general, se puede concluir que el tratamiento con PCA a las concentraciones ensayadas (200 y 300  $\mu\text{M}$ ) tiene un efecto reductor sobre los niveles de ROS en *C. elegans*, siendo capaz de contrarrestar el aumento de estas especies reactivas causado por el estrés térmico, manteniendo su concentración en valores basales o incluso inferiores a los existentes en gusanos cultivados en ausencia de PCA. Este efecto se manifiesta en gusanos más jóvenes (día 2 de adulto), lo que está en línea con los resultados obtenidos con

relación a supervivencia tras estrés térmico, también más favorables en esos grupos de ensayo. Parece, de este modo, que la resistencia a estrés conferida por el PCA podría estar, al menos en parte, relacionada con su capacidad para modular los niveles de ROS en *C. elegans*. Los mecanismos de acción por los que el PCA ejerce sus efectos en este sentido no pueden, sin embargo, ser concluidos del estudio realizado aunque de acuerdo con lo recogido de la bibliografía se podrían atribuir tanto a una actividad antioxidante directa como a una posible regulación de procesos de señalización celular, como la modulación de factores de transcripción relacionados con la ruta de señalización de la insulina/IGF-1, SKN-1/Nrf-2, y de la actividad de moléculas antioxidantes endógenas, como GSH, GPx, SOD y CAT.

La protección ejercida por el PCA frente a estrés oxidativo no se refleja en una mejora la duración de vida del gusano con relación a gusanos no tratados, aún cuando algunos autores indican que ambos aspectos podrían estar relacionados. Ello sugiere que los mecanismos de acción subyacentes a los efectos del PCA en estos procesos son diferentes. Es necesario realizar estudios adicionales para establecer los mecanismos moleculares realmente implicados en los efectos protectores del PCA frente al estrés oxidativo, utilizando, por ejemplo, cepas mutantes del gusano o ensayos de expresión génica.

### 4.3 Estudios con ácido vanílico

El ácido vanílico (ácido 3-metoxi-4-hidroxibenzoico, VA) (Figura IV.3.1) es un ácido fenólico que se puede encontrar en diferentes frutos, hierbas, especias y granos de cereales, entre otros productos vegetales. Además, es utilizado en la industria alimentaria como saborizante, y en perfumería, ya que posee un agradable aroma a vainilla debido a su estructura molecular, que corresponde a la forma oxidada de la vanilina (aldehído vanílico) (Almeida et al., 2016).

El ácido vanílico se ha detectado en niveles significativos en plasma, orina y heces después del consumo de una dieta rica en flavonoides, principalmente antocianos, como metabolito resultante de su degradación por la microbiota intestinal, pudiendo también formarse por metilación del PCA por enzimas de fase II (Koli et al., 2010; Czank et al., 2013; De Ferrars et al., 2014a,b; Pimpão et al., 2014; McKay et al., 2015). Se han descrito algunas actividades biológicas del VA beneficiosas para la salud, como acción antioxidante, antimicrobiana, cardioprotectora, hepatoprotectora, neuroprotectora y antiapoptótica (Cheng et al., 2014; Kumar et al., 2014; Amin et al., 2015; Calixto-Campos et al., 2015; Almeida et al., 2016; Warner et al., 2017).

En este trabajo se estudiaron los efectos del ácido vanílico (200  $\mu$ M) en la resistencia frente al estrés oxidativo inducido térmicamente y los niveles intracelulares de ROS en *C. elegans*.

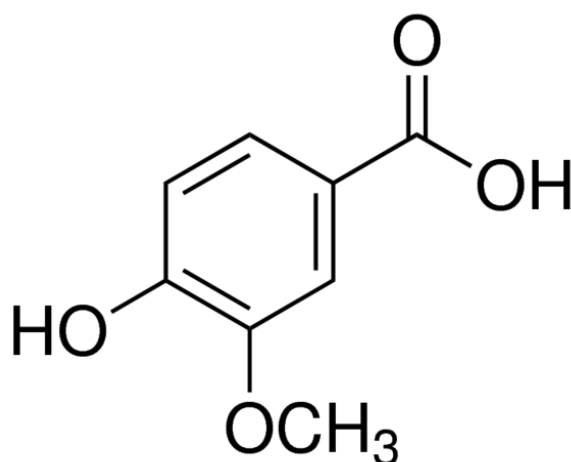


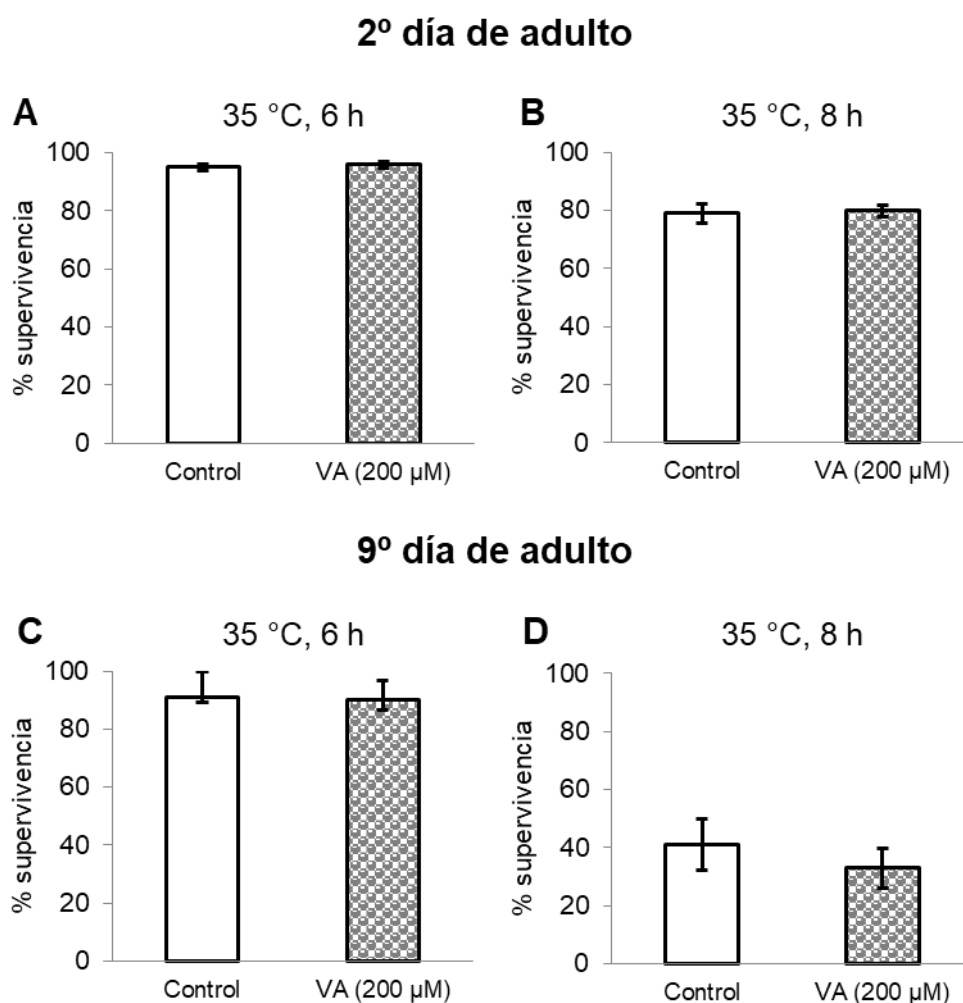
Figura IV.3.1. Estructura del ácido vanílico.

### 4.3.1 Ensayos de estrés térmico

Se evaluó la influencia del tratamiento con VA (200  $\mu$ M) sobre la resistencia frente al estrés oxidativo inducido térmicamente en *C. elegans*. El estudio se llevó a cabo en dos estados de desarrollo del nematodo: segundo y noveno día de adulto. Los nematodos eran cultivados en medio NGM que contenía VA (200  $\mu$ M) desde que entraban en la fase larvaria L1 hasta el día de aplicación del estrés, en que eran sometidos a una temperatura de 35 °C durante 6 u 8 h, para después comparar su tasa de supervivencia con la de una población control de nematodos sometida a las mismas condiciones de estrés, pero cultivada en ausencia del compuesto.

La Figura IV.3.2 muestra los porcentajes de supervivencia de los gusanos tras ser sometidos a estrés térmico. Se puede observar que el tratamiento en *C. elegans* con VA no tuvo apenas influencia sobre la resistencia del gusano al estrés, excepto en el ensayo realizado a día 9, donde para un estrés de 8 h se encontró una disminución no significativa ( $p < 0,05$ ) en el porcentaje de supervivencia de los nematodos tratados previamente con VA, respecto a los no tratados (Figura IV.3.2, D). Estos resultados difieren de los encontrados en los ensayos con PCA a la misma concentración, donde se observaba que la exposición previa al metabolito aumentaba, en todas las condiciones estudiadas, el porcentaje de supervivencia de *C. elegans* con respecto al control, en algunos casos de modo significativo ( $p < 0,05$ ) en el segundo día de adulto de adulto a las 8 h y en el noveno día de adulto a las 6 h.





**Figura IV.3.2.** Porcentajes de supervivencia de *C. elegans* sometidos a estrés térmico (35 °C) durante 6 h (A y C) u 8 h (B y D) en el segundo y noveno día de adulto, cultivados en ausencia (controles) o presencia de VA (200 µM). En cada caso se realizaron tres experimentos independientes (300 gusanos por grupo). Los resultados representan la media  $\pm$  SEM. La significación estadística se calculó usando la prueba Chi Cuadrado ( $p < 0,05$ ).

Estudios realizados en medios *in vitro* han constatado la actividad antioxidante del VA (Chou et al., 2010a; Tai et al., 2012), incluso superior a la del PCA en algunos ensayos (Rice-Evans et al. 1996; Dueñas et al., 2011). Esta mayor actividad no parece mantenerse *in vivo*, al menos en el modelo utilizado y en las condiciones ensayadas. Realmente la existencia de actividad antioxidante *in vitro* no siempre se corresponde con la que puede ser ejercida en un sistema biológico, ya sea por razones de biodisponibilidad o por el mecanismo considerado para su valoración. Además, como se ha mencionado, la capacidad

antioxidante de los compuestos fenólicos en los medios biológicos no necesariamente se debe a una acción antioxidante directa, sino que puede implicar la modulación de procesos de señalización intracelular con estimulación de los mecanismos endógenos de defensa (González-Paramás et al., 2019). En cualquier caso, tampoco parece que el VA tenga una influencia destacada en la estimulación de esos procesos, al menos a la concentración ensayada.

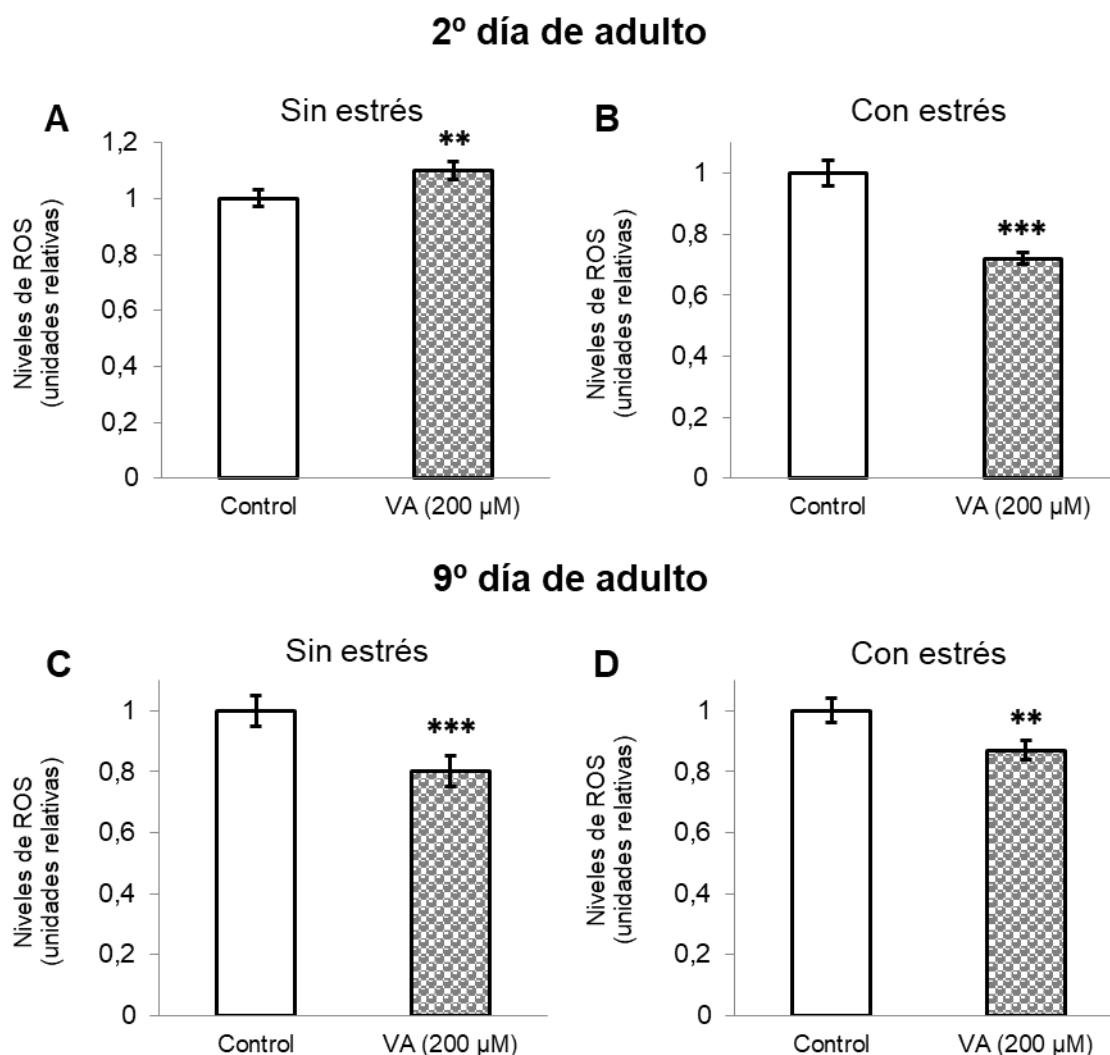
La distinta respuesta de los derivados metilados respecto a sus precursores fenólicos fue también observada por Surco-Laos et al. (2011) al estudiar los efectos del tratamiento de quercetina, isoramnetina (3'-O-metilquercetina) y tamarixetina (4'-O-metilquercetina) en la resistencia frente al estrés oxidativo en *C. elegans*. Esos autores encontraron que la quercetina ofrecía mayor protección cuando se aplicaba estrés térmico en el primer día de adulto, mientras que la tamarixetina era más eficiente en los gusanos sometidos a estrés en el sexto día de adulto. En el ensayo de estrés oxidativo inducido con juglona, de manera similar, la quercetina proporcionaba una protección significativamente mayor que sus derivados metilados en el primer día de adulto, mientras que la quercetina y la isoramnetina eran igualmente eficaces cuando se inducía el estrés oxidativo en el día 6 de adulto.

#### 4.3.2 Determinación de niveles intracelulares de ROS

Se realizaron también ensayos para determinar los niveles intracelulares de ROS en gusanos control y gusanos previamente tratados con VA (200  $\mu$ M), sometidos o no a estrés térmico (35 °C, 2 h) en el segundo y noveno día de adultos. En la Figura IV.3.3A se puede observar que el día 2 de adulto en gusanos no sometidos a estrés térmico existía un aumento significativo ( $p < 0,01$ ) del 10 % en los niveles de ROS en la población tratada con VA respecto al control. Por el contrario, en el resto de los ensayos se producía una disminución significativa en la concentración de estas especies reactivas. Se trata de un resultado paradójico, ya que sugiere que el VA se estaría comportando como un estresante en gusanos jóvenes en condiciones normales de crecimiento, mientras que aportaría protección en individuos de más edad o bajo condiciones de estrés. Se ha propuesto que en los sistemas biológicos algunos compuestos fenólicos podrían comportarse como agentes estresantes ligeros, por su

capacidad para transformarse en especies reactivas (quinonas y semiquinonas), provocando cierto grado de estrés oxidativo (Halliwell, 2008; Tang y Halliwell, 2010), lo que quizás podría explicar el aumento observado en los gusanos jóvenes. Este estrés de baja intensidad inducido por el compuesto fenólico conduciría a la activación de las defensas antioxidantes endógenas, de manera que los individuos estarían más preparados para enfrentarse a una agresión externa, como puede ser la aplicación de un choque térmico, o al propio estrés oxidativo derivado del envejecimiento, lo que en definitiva les aportaría mayor capacidad de respuesta en la modulación de los niveles de sustancias reactivas (Halliwell, 2008; Tang y Halliwell, 2010). Este posible efecto protector podría explicar los resultados encontrados en los otros grupos de ensayo, donde se observaron descensos significativos de entre el 13 % y el 28 % los niveles de ROS (Figuras IV.3.3, B, C y D).

Estos descensos son mayores que los encontrados en los ensayos con PCA a la misma concentración (200  $\mu$ M) en los nematodos sometidos a estrés en el segundo y noveno día de adulto (Figura IV.2.5). Sin embargo, en este caso, la disminución en la concentración de ROS inducida por el VA no se refleja en una mayor resistencia de los gusanos frente al estrés térmico (Figura IV.3.2), indicando que una disminución en los niveles de ROS no necesariamente conduce a una mayor protección frente al estrés térmico/oxidativo.



**Figura IV.3.3.** Niveles intracelulares relativos de ROS, determinados con DCFH-DA, en *C. elegans* en los días 2 y 9 de adulto, cultivados en presencia o ausencia de VA (200 µM), no sometidos (A y C) y sometidos a estrés térmico (B y D). En cada caso se realizaron tres experimentos independientes. Los resultados están normalizados respecto al control y representan la media  $\pm$  SEM. La significación estadística se calculó mediante ANOVA de un factor (\*\* $p < 0,01$  y \*\*\* $p < 0,001$ ).

Como se discutió en apartados anteriores, estudios en líneas celulares e *in vivo* han demostrado la posible implicación de factores de transcripción relacionados con la ruta de la insulina y de enzimas antioxidantes endógenas en los efectos ejercidos por los ácidos fenólicos (Masella et al., 2004; An et al., 2006; Giovannini et al., 2008; Vari et al., 2011; Zhang et al., 2011; Kim et al., 2014). En el caso del VA, se han descrito efectos antiinflamatorios y antioxidantes, tanto en líneas celulares como en roedores. Kumar et al. (2014) encontraron que el VA

ejercía un efecto de cardioprotección en ratas con hipertensión inducida, al aumentar la expresión del ARNm de NOS endotelial (eNOS), que se ve reducida en esta condición, mejorando la tensión arterial. Amin et al. (2017) describieron para el VA un efecto protector frente a la neurotoxicidad inducida en ratones, mejorando los niveles de GSH endógeno, disminuyendo la generación de ROS e induciendo la activación del factor de transcripción Nrf2. Calixto et al. (2015) encontraron que el VA presenta propiedades analgésicas y antiinflamatorias en una amplia gama de modelos murinos de inflamación, relacionadas con sus efectos antioxidantes, al impedir el agotamiento de moléculas antioxidantes (GSH, SOD, CAT y GR) y la inhibición de la producción de citocinas proinflamatorias relacionada con NF- $\kappa$ B. En células endoteliales humanas se vio que el VA es capaz de reducir los niveles de VCAM-1 (Warner et al., 2017) y la citocina pro-inflamatoria IL-6 (Amin et al., 2015; Warner et al., 2017), por lo que tiene efectos antiinflamatorios. Es conocido que existe una estrecha relación entre el estrés oxidativo y los procesos inflamatorios, ya que la generación de ROS, así como de RNS, es capaz de activar factores de transcripción sensibles a estímulos redox, que inducen la expresión de moléculas pro-inflamatorias que conducen a un estado de inflamación crónica. Además, la inflamación en sí misma podría contribuir a la generación de ROS y RNS que amplifique los daños en las células y órganos diana (Masella et al., 2012).

#### 4.3.3 Conclusiones parciales

El tratamiento de *C. elegans* con VA (200  $\mu$ M) produce una disminución significativa en los niveles de ROS en gusanos adultos en etapas postreproductivas y sometidos a estrés, mientras que da lugar a un aumento en gusanos jóvenes en condiciones normales de cultivo. Este resultado sugiere que el VA se comporta como un estresante en gusanos jóvenes, mientras que aportaría protección en individuos de más edad o bajo condiciones de estrés. Una posible explicación podría ser que el VA se comportase como agente estresante en el sistema biológico, provocando cierto grado de estrés oxidativo. Sin embargo, este estrés de baja intensidad conduciría a la activación de las defensas antioxidantes endógenas, de manera que los individuos estarían más preparados para enfrentarse a una agresión externa, como la aplicación de un

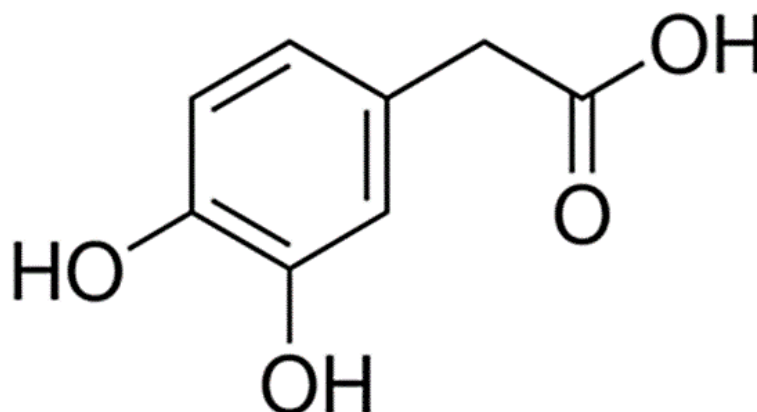
choque térmico, o al propio estrés oxidativo derivado del envejecimiento, lo que en esas circunstancias les conferiría mayor capacidad de respuesta para controlar la producción de especies reactivas. En todo caso, la disminución en las concentraciones de ROS inducida por el VA no se refleja en una mayor resistencia de los gusanos frente al estrés térmico, indicando que un menor nivel de ROS no necesariamente conduce a una mayor protección frente al estrés, que posiblemente podría estar más determinada por la capacidad de los compuestos para influir sobre rutas de señalización que por su potencial para reducir las concentraciones de ROS intracelulares. En este sentido, diversos autores han descrito propiedades antiinflamatorias y antioxidantes para el VA relacionadas con su capacidad para disminuir citocinas pro-inflamatorias y modular factores de transcripción, como Nrf2, relacionado con la ruta de señalización de la insulina/IGF-1, y la producción de moléculas antioxidantes endógenas.

#### 4.4 Estudios con ácido 3,4-dihidroxifenilacético

El ácido 3,4-dihidroxifenilacético (DHPAA) (Figura IV.4.1) es un metabolito fenólico microbiano comúnmente encontrado en concentraciones relevantes en plasma, orina y heces después del consumo de dietas ricas en distintos compuestos fenólicos (Rios et al., 2003; Jaganath et al., 2006; Urpi-Sarda et al., 2009; De Ferrars et al., 2014a,b; McKay et al., 2015; Feliciano et al., 2017, Sasot et al., 2017). Se ha descrito como uno de los metabolitos fenólicos microbianos más abundante tras la ingesta de flavonoles (Olthoff et al., 2003).

Aunque se conoce poco sobre su actividad y mecanismos de acción, algunos estudios *in vitro* han evidenciado que el DHPAA posee alta capacidad antioxidante (Jaganath et al., 2009; Tang et al., 2016), actividad anticancerígena (Gao et al., 2006), de protección hepática (Carrasco-Pozo et al., 2015) y efecto neuroprotector (González-Sarriás et al., 2017).

En el presente trabajo se evaluó el efecto de diferentes concentraciones de DHPAA en la resistencia frente al estrés oxidativo inducido térmicamente (25, 100, 150 y 200  $\mu\text{M}$ ) y en los niveles de ROS (25, 100 y 150  $\mu\text{M}$ ) en *C. elegans*.



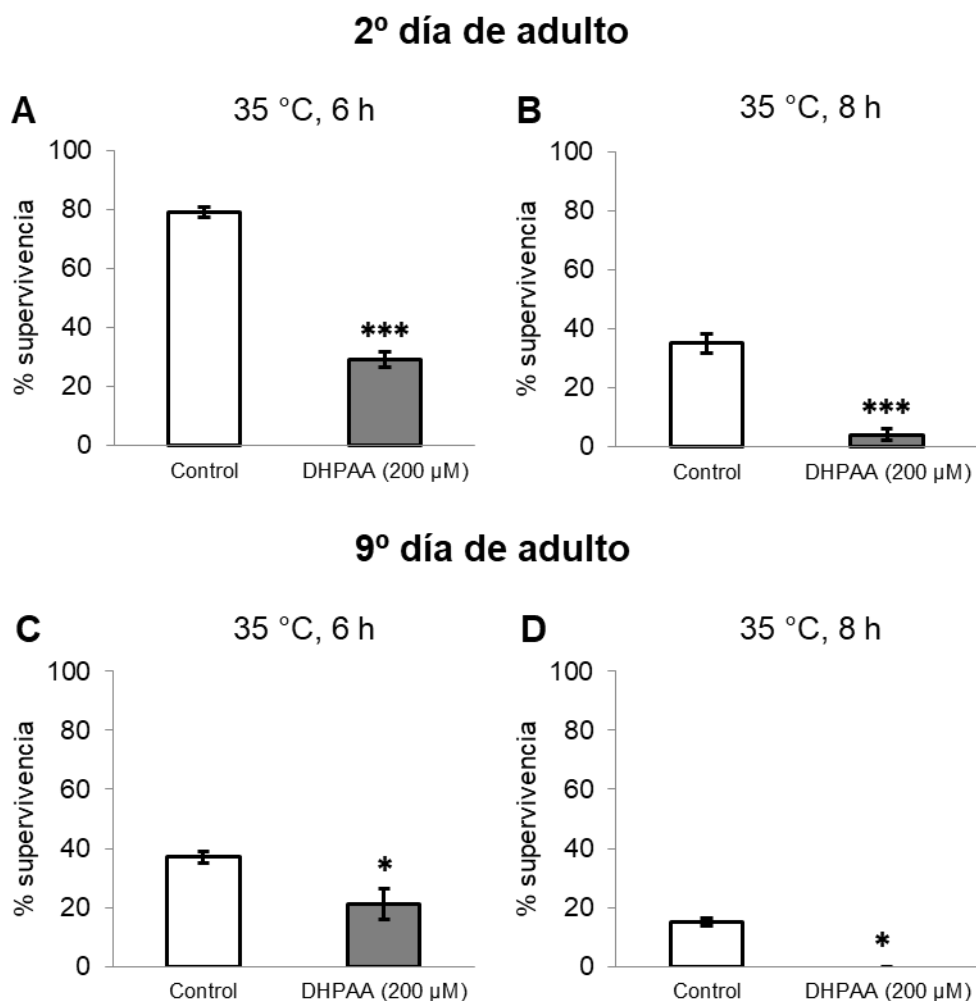
**Figura IV.4.1.** Estructura del ácido 3,4-dihidroxifenilacético.

#### 4.4.1 Ensayos de estrés térmico

Para estos estudios, se trabajó inicialmente con una concentración de 200  $\mu\text{M}$  en el medio de cultivo, para posteriormente, a la vista de los resultados obtenidos, ensayar concentraciones más bajas (25, 100 y 150  $\mu\text{M}$ ). Como en los casos anteriores, el estudio se llevó a cabo en dos estados de desarrollo del nematodo: segundo y noveno día de adulto. Los nematodos fueron cultivados en medio NGM que contenía DHPAA desde que entraban en la fase larvaria L1, hasta el día del ensayo, en que eran sometidos a una temperatura de 35 °C durante 6 y 8 h, para después comparar su tasa de supervivencia con la de una población control sometida a las mismas condiciones de estrés, pero cultivada en ausencia del compuesto.

La Figura IV.4.2 muestra los porcentajes de supervivencia de los nematodos tratados con 200  $\mu\text{M}$  de DHPAA tras ser sometidos a estrés térmico en las distintas condiciones ensayadas. Se puede apreciar que se produjo un descenso notable en la tasa de supervivencia en los nematodos. En el día 2 de adulto, se observó una disminución significativa ( $p < 0,001$ ) en la población de *C. elegans* con un estrés de 6 h, al pasar de un porcentaje de supervivencia del 79 % en los gusanos sin tratamiento a un 29 % en los tratados previamente con DHPAA y para un estrés de 8 h, de un 35 % en los nematodos sin tratamiento a un 4 % en los que habían sido cultivados con el compuesto (Figuras IV.4.2, A y B). Resultados similares fueron obtenidos en los ensayos realizados a día 9 de adulto (Figuras IV.4.2, C y D), donde se observó que a las 6 h de estrés térmico el porcentaje de supervivencia de los gusanos control fue de un 37 % y de los tratados con DHPAA de un 21 %, mientras que a las 8 h fue de un 15 % en los nematodos sin tratamiento pasando a la muerte de la totalidad de la población en los expuestos previamente a DHPAA. En ambos casos las diferencias fueron significativas ( $p < 0,05$ ).





**Figura IV.4.2.** Porcentajes de supervivencia de *C. elegans* sometidos a estrés térmico (35 °C) durante 6 h (A y C) u 8 h (B y D) en el segundo y noveno día de adulto, cultivados en ausencia (controles) o presencia de DHPAA (200 µM). En cada caso se realizaron tres experimentos independientes (300 gusanos por grupo). Los resultados representan la media  $\pm$  SEM. La significación estadística se calculó usando la prueba Chi Cuadrado (\* $p < 0,05$  y \*\*\* $p < 0,001$ ).

La disminución en la supervivencia de los gusanos tratados con DHPAA a 200 µM parece sugerir la existencia de un efecto tóxico del compuesto a esta concentración. Como se mencionó anteriormente, algunos compuestos fenólicos inducen respuestas horméticas (ver comentarios en apartado 4.2.1). Por esta razón, con el fin de comprobar si los resultados obtenidos podían corresponder a una respuesta de este tipo, se decidió ensayar concentraciones más bajas de DHPAA (25, 100 y 150 µM).

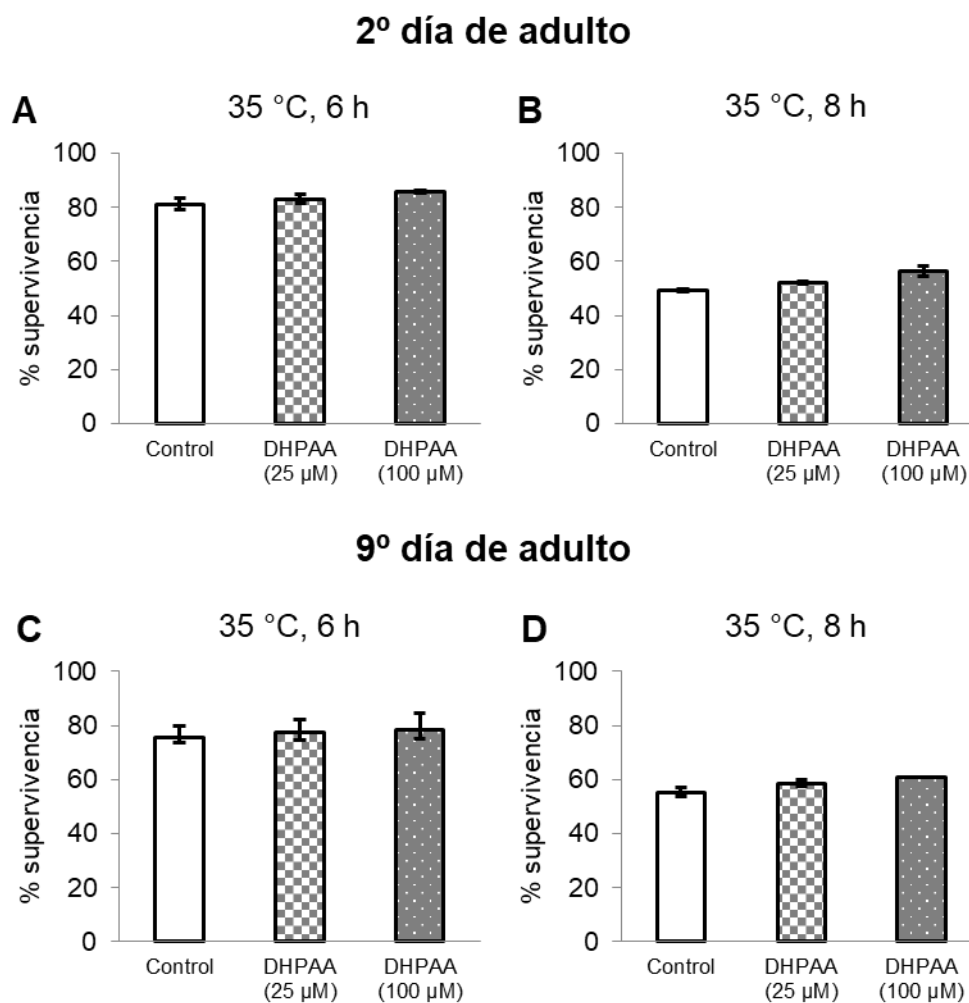
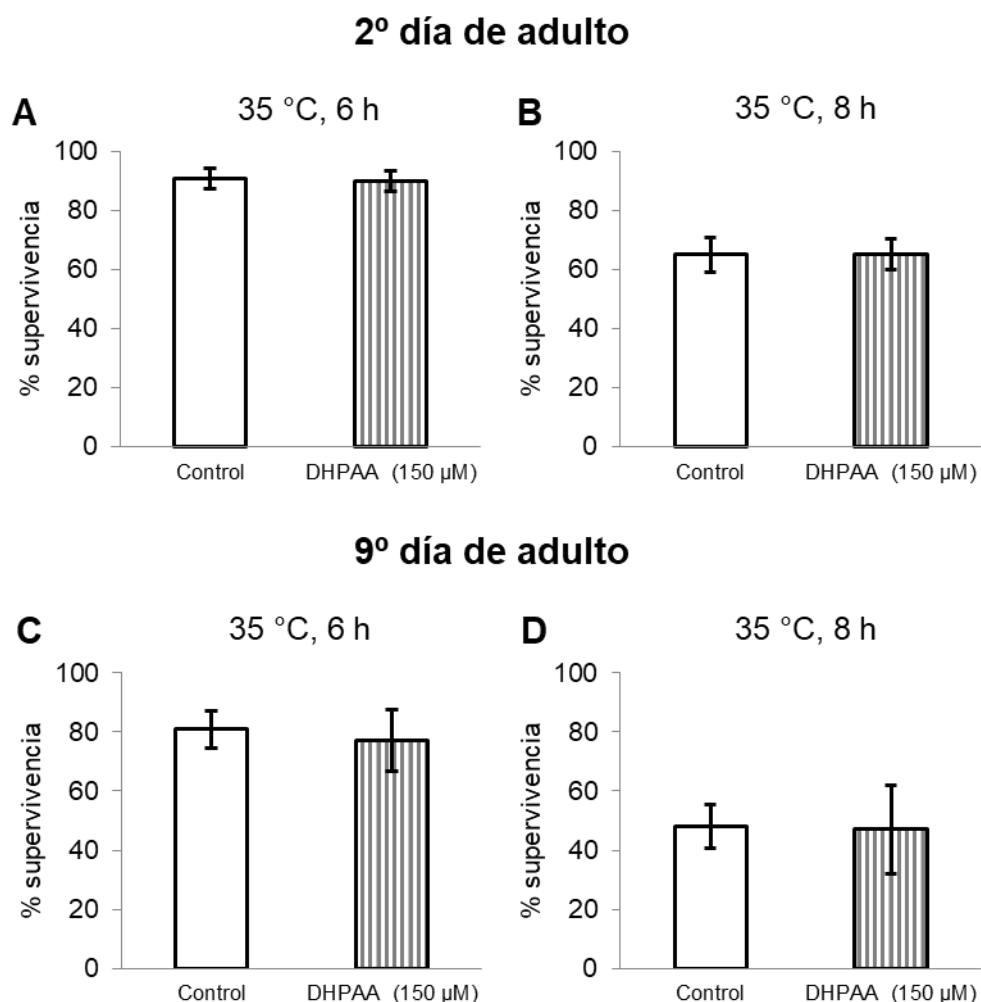


Figura IV.4.3. Porcentajes de supervivencia de *C. elegans* sometidos a estrés térmico (35 °C) durante 6 h (A y C) u 8 h (B y D) en el segundo y noveno día de adulto, cultivados en ausencia (controles) o presencia de DHPAA (25 y 100 µM). En cada caso se realizaron tres experimentos independientes (300 gusanos por grupo). Los resultados representan la media  $\pm$  SEM. La significación estadística se calculó usando la prueba Chi Cuadrado ( $p < 0,05$ ).

En la Figura IV.4.3 se recogen los resultados obtenidos en los ensayos con 25 y 100 µM. Como se puede comprobar, esas concentraciones de DHPAA en el medio de cultivo ya no conducían a un descenso en la tasa de supervivencia en los gusanos tratados, sino que incluso se producía una ligera mejora en la resistencia frente al estrés térmico en *C. elegans*, aunque en ninguno de los casos era estadísticamente significativa ( $p < 0,05$ ). Sin embargo, en los ensayos realizados con una concentración de 150 µM de DHPAA se observaba una ligera disminución no significativa ( $p < 0,05$ ) en la tasa de supervivencia de los gusanos

tratados respecto al grupo control (Figura IV.4.4). Esta observación, unida a los resultados obtenidos en los ensayos con 200  $\mu\text{M}$ , parece sugerir que esta concentración 150  $\mu\text{M}$  de DHPAA podría encontrarse en el límite a partir del cual pasarían a producirse efectos indeseables para este compuesto.



**Figura IV.4.4.** Porcentajes de supervivencia de *C. elegans* sometidos a estrés térmico (35 °C) durante 6 h (A y C) u 8 h (B y D) en el segundo y noveno día de adulto, cultivados en ausencia (controles) o presencia de DHPAA (150  $\mu\text{M}$ ). En cada caso se realizaron tres experimentos independientes (300 gusanos por grupo). Los resultados representan la media  $\pm$  SEM. La significación estadística se calculó usando la prueba Chi Cuadrado ( $p < 0,05$ ).

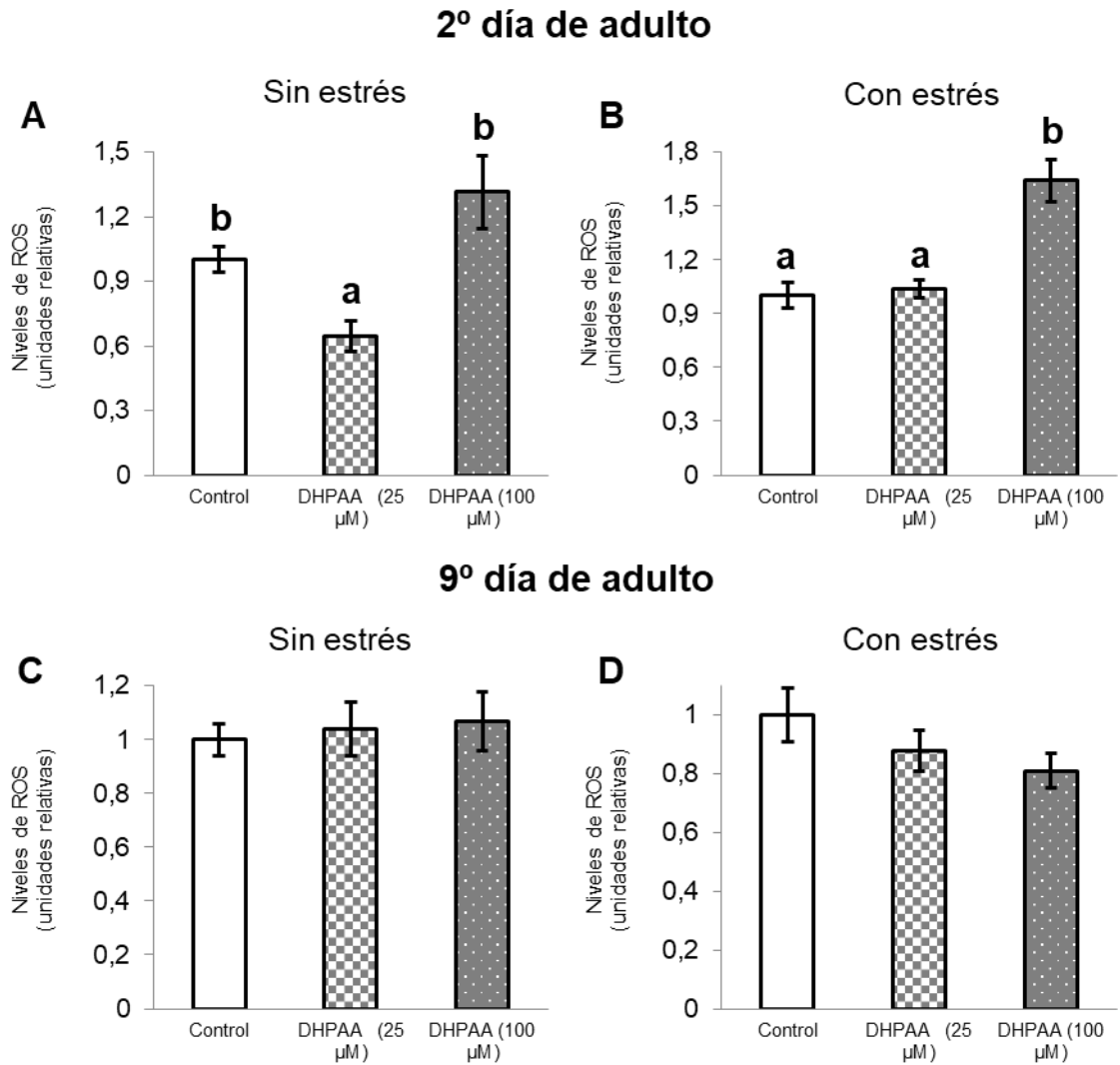
Este conjunto de resultados obtenidos en los ensayos de estrés térmico parece confirmar la existencia de un comportamiento hormético en la respuesta de *C. elegans* frente al DHPAA. Queda por establecer lo que ocurriría si el

gusano es cultivado en presencia de concentraciones más bajas de DHPAA, es decir, si mejoraría la resistencia al estrés o no se producirían efectos significativos. Por ejemplo, Saul et al. (2011) no encontraron que el ácido elágico mejorara la protección de *C. elegans* frente a estrés térmico a bajas concentraciones en el medio de cultivo, mientras que producía efectos adversos, reduciendo la resistencia al estrés, a dosis más elevadas (en ese caso, 300  $\mu\text{M}$ ). Sin embargo, observaron un efecto beneficioso en la extensión de la vida del nematodo para una concentración 50  $\mu\text{M}$  de ácido elágico, que explicaron por un efecto mimetizador de la restricción calórica y mecanismos horméticos. Esta observación apoyaría que al menos parte de los mecanismos implicados en la regulación de la longevidad y resistencia al estrés en *C. elegans* podrían ser independientes.

#### 4.4.2 Determinación de niveles intracelulares de ROS

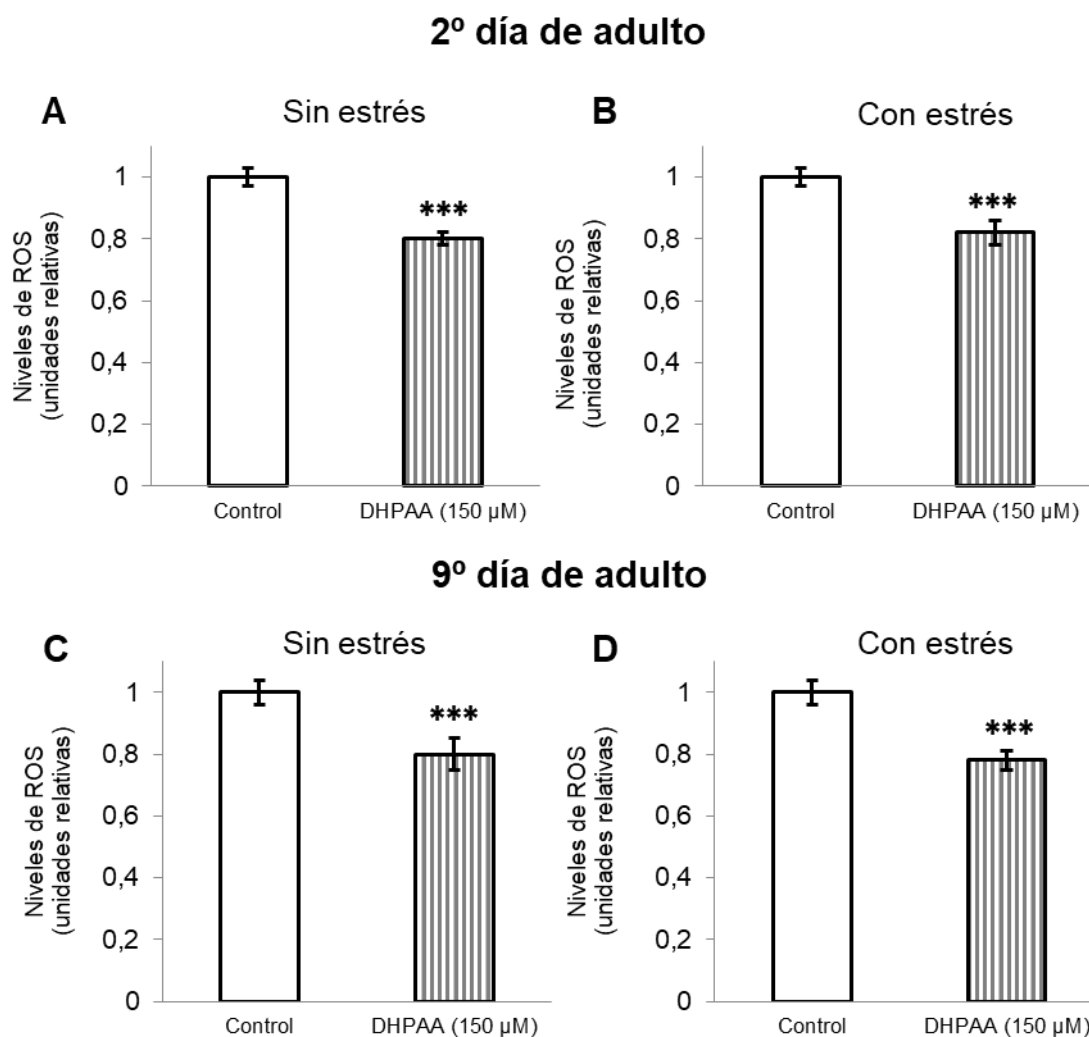
Se determinaron también los niveles de ROS en nematodos control y cultivados en presencia de DHPAA (25  $\mu\text{M}$ , 100  $\mu\text{M}$  y 150  $\mu\text{M}$ ) sometidos o no a estrés térmico (35 °C, 2 h), en el segundo y noveno día de adultos.

En la Figura IV.4.5, A se puede observar que, en los estudios realizados el día 2 de adulto, para una concentración 25  $\mu\text{M}$  de DHPAA, los gusanos no sometidos a estrés térmico experimentaban una disminución significativa ( $p < 0,001$ ) en los niveles intracelulares de ROS respecto al control, mientras que a la concentración de 100  $\mu\text{M}$  se producía un aumento, aunque no significativo ( $p < 0,05$ ). En gusanos sometidos a estrés térmico también se encontró una elevación de los niveles de ROS en el tratamiento con 100  $\mu\text{M}$  de DHPAA, en este caso significativa ( $p < 0,001$ ) con relación al control, mientras que no existían diferencias en la población tratada con 25  $\mu\text{M}$  de DHPAA (Figura IV.4.5, B). Sin embargo, en los ensayos realizados a día 9 de adulto los resultados no mostraron ninguna diferencia significativa ( $p < 0,05$ ) en cuanto a niveles de ROS entre gusanos control y gusanos tratados con DHPAA (25  $\mu\text{M}$  y 100  $\mu\text{M}$ ), ni en presencia ni en ausencia de estrés (Figura IV.4.5, C y D).



**Figura IV.4.5.** Niveles intracelulares relativos de ROS, determinados con DCFH-DA, en *C. elegans* en los días 2 y 9 de adulto, cultivados en presencia o ausencia de DHPAA (25 y 100  $\mu$ M), no sometidos (A y C) y sometidos a estrés térmico (B y D). En cada caso se realizaron tres experimentos independientes. Los resultados están normalizados respecto al control y representan la media  $\pm$  SEM. Las letras indican diferencias significativas entre los diferentes grupos ( $p < 0,05$ ) mediante ANOVA de un factor.

Por el contrario, el tratamiento con una concentración de DHPAA de 150  $\mu$ M produjo una disminución significativa ( $p < 0,001$ ) en los niveles de ROS con respecto al grupo control de orden similar en todas las condiciones ensayadas (Figura IV.4.6).



**Figura IV.4.6.** Niveles intracelulares relativos de ROS, determinados con DCFH-DA, en *C. elegans* en los días 2 y 9 de adulto, cultivados en presencia o ausencia de DHPAA (150 µM), no sometidos (A y C) y sometidos a estrés térmico (B y D). En cada caso se realizaron tres experimentos independientes. Los resultados están normalizados respecto al control y representan la media  $\pm$  SEM. La significación estadística se calculó mediante ANOVA de un factor (\*\*\*)  $p < 0,001$ .

Los resultados obtenidos con relación a la influencia del DHPAA sobre los niveles de ROS no muestran una tendencia clara. Mientras a la concentración de 100 µM parece inducir un efecto pro-oxidante en gusanos jóvenes (día 2 de adulto), tanto en presencia como en ausencia de estrés, esta tendencia cambia con la edad del gusano y el aumento en la concentración de DHPAA. De este modo, a día 9 de vida del gusano, no hay diferencias significativas entre niveles de ROS en los individuos respecto a sus controles a las concentraciones más bajas ensayadas (25 y 100 µM), e incluso existe cierta disminución de especies

reactivas cuando son sometidos a estrés. El descenso en los niveles de ROS es, sin embargo, evidente en los gusanos cultivados en presencia de una concentración 150  $\mu$ M de DHPAA, que es notable y significativa en presencia y ausencia de estrés tanto en individuos jóvenes como envejecidos. Estos resultados sugieren que podría existir una respuesta compensatoria favorecida por el tiempo de exposición al compuesto (como indicaría la tendencia observada en el tratamiento a las concentraciones más bajas en los gusanos de más edad) y el aumento en su concentración (efecto observado a la concentración de DHPAA más elevada), que conduciría a una estimulación en los mecanismos de defensa antioxidante y, subsecuentemente, en un mayor control de la producción de especies reactivas.

Algunos autores han constatado la existencia de actividad antioxidante *in vitro* de DHPAA, relacionada con la presencia de un grupo catecol en su estructura (Jaganath et al., 2009; Tang et al., 2016). En nuestro conocimiento, el efecto *in vivo* de DHPAA no se ha estudiado anteriormente, aunque existen trabajos con líneas celulares, que indican su capacidad para modular el estrés oxidativo. Carrasco-Pozo et al. (2015) estudiaron el efecto de DHPAA en células pancreáticas  $\beta$  con altos niveles de colesterol, encontrando que el tratamiento con el mismo aumentaba la translocación de Nrf2 al núcleo, disminuyendo el grado de estrés oxidativo y protegiendo frente a la secreción alterada de insulina, la disfunción mitocondrial y la apoptosis celular. Por su parte, González-Sarrías et al. (2017) describieron un efecto neuroprotector del DHPAA al prevenir la apoptosis neuronal mediante la disminución de los niveles de ROS y de la actividad de la caspasa-3.

Al igual que ocurría con el ácido vanílico, los cambios en las concentraciones de ROS no guardan correlación con la resistencia a estrés térmico en los gusanos tratados con DHPAA. Nuevamente, esto indicaría que los procesos implicados en la protección de *C. elegans* frente al daño oxidativo estarían más determinados por mecanismos que implicarían rutas de señalización específicas que por su capacidad, directa o indirecta, para reducir los niveles de especies reactivas de oxígeno.

#### 4.4.2 Conclusiones parciales

Los resultados obtenidos parecen indicar la existencia de un comportamiento hormético en la resistencia de *C. elegans* al estrés térmico inducida por el DHPAA, conduciendo a efectos perjudiciales con el aumento de concentración. Sin embargo, estos efectos no guardan relación aparente con la capacidad del compuesto para modular los niveles de especies reactivas de oxígeno. En este sentido, el DHPAA (100  $\mu\text{M}$ ) parece inducir un efecto prooxidante en gusanos jóvenes, que conduce a una elevación en los niveles de ROS, tendencia que se invierte con el aumento en la edad del gusano y la concentración de DHPAA, hasta el punto de provocar una caída notable a la concentración más alta ensayada (150  $\mu\text{M}$ ), en presencia y ausencia de estrés, tanto en individuos jóvenes como envejecidos. Estas observaciones apuntan a que podría existir una respuesta compensatoria favorecida por el tiempo de exposición de *C. elegans* al compuesto y el aumento en su concentración, que estimularía los mecanismos de defensa antioxidante, favoreciendo un control más ajustado de la producción de especies reactivas. Los cambios en las concentraciones de ROS, sin embargo, no guardan correlación con la resistencia a estrés térmico de los gusanos, lo que parece sugerir que los procesos implicados en la protección de *C. elegans* frente al daño oxidativo para este compuesto estarían más determinados por mecanismos que implicarían rutas de señalización específicas que por su capacidad, directa o indirecta, para reducir los niveles de especies reactivas de oxígeno.



## 4.5 Estudios con ácido cafeico

El ácido cafeico (ácido 3,4-dihidroxicinámico, CA) (Figura IV.5.1) puede estar presente en sus fuentes naturales tanto en forma libre como, mucho más frecuente, combinado con azúcares o esterificado con ácidos orgánicos, como quínico o tartárico, o grupos etilfenol. Aunque, como ácido se absorbe fácilmente en el intestino delgado, en forma esterificada, como ocurre en los ácidos clorogénicos (ácidos cafeoilquínicos), es pobremente absorbido, llegando en gran medida al colon, donde es transformado por la microbiota (Gonthier et al., 2006). Asimismo, el CA se puede encontrar en el cuerpo humano después del consumo de diferentes compuestos fenólicos, como antocianos, flavonoles y flavan-3-oles, procedente de su degradación por la flora intestinal (Urpi et al., 2009; Koli et al., 2010; De Ferrars et al., 2014a,b; Pimpão et al., 2014; McKay et al., 2015; Sasot et al., 2017).

Se han descrito para el CA distintas actividades biológicas con impacto en la salud humana, como propiedades antioxidantes, anticancerígenas, antimicrobianas, antivirales, antiinflamatorias e inmunomoduladoras (Dong et al., 2012; Silva et al., 2014; Damasceno et al., 2017).

En este trabajo se buscó profundizar en los efectos biológicos del CA, estudiando su influencia en la protección frente al estrés oxidativo, niveles de ROS y de superóxido y longevidad, así como explorando los mecanismos moleculares relacionados con estos efectos, utilizando *C. elegans* como modelo.

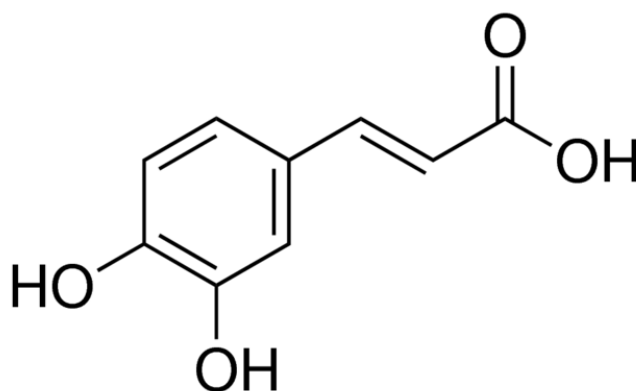
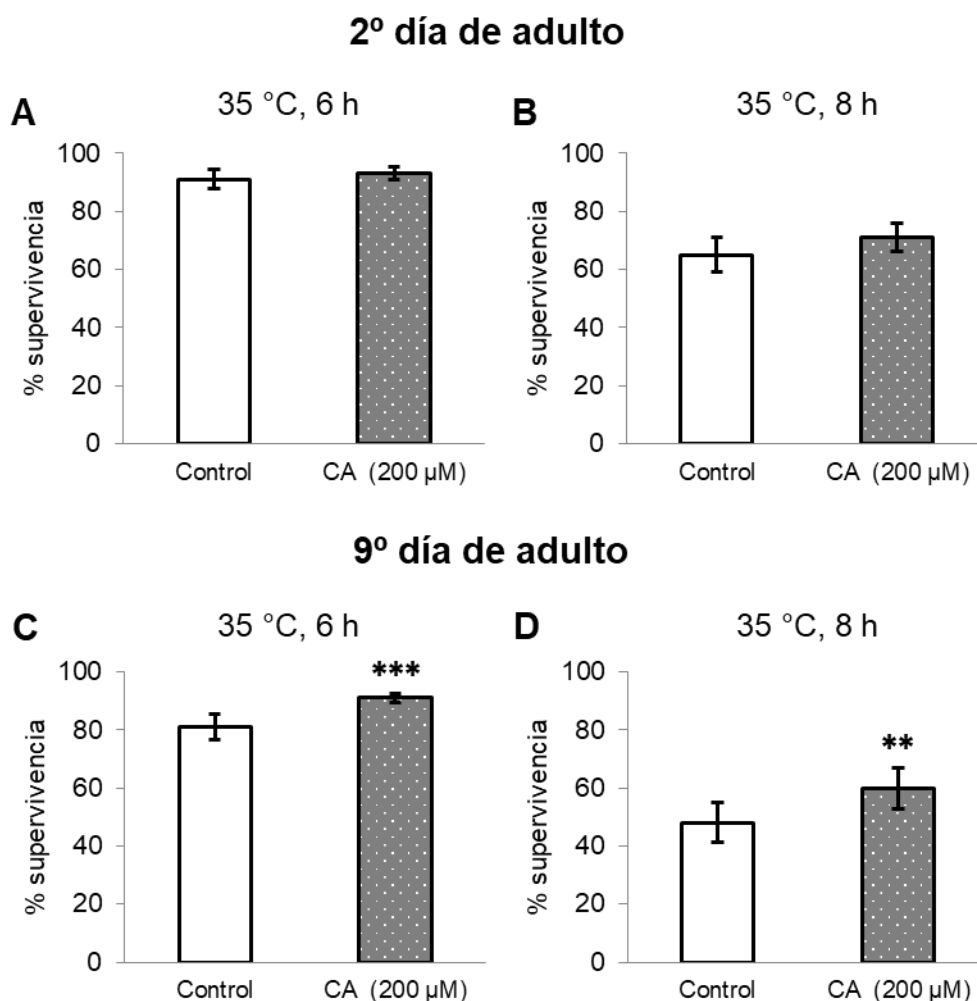


Figura IV.5.1. Estructura del ácido cafeico.

#### 4.5.1 Ensayos de estrés térmico

Se evaluó el efecto del tratamiento con CA en la resistencia frente al estrés oxidativo inducido térmicamente en *C. elegans*. Los ensayos se realizaron utilizando una concentración en el medio de cultivo de 200  $\mu\text{M}$  y 300  $\mu\text{M}$  del compuesto. La aplicación del estrés se realizó en dos estados de desarrollo del nematodo: segundo y noveno día de adulto. Los nematodos eran cultivados en medio NGM que contenía CA desde que entraban en la fase larvaria L1, hasta el día del ensayo, en que eran sometidos a una temperatura de 35 °C durante 6 y 8 h, para después comparar su tasa de supervivencia con la de una población control de nematodos sometida a las mismas condiciones de estrés, pero cultivada en ausencia del compuesto.

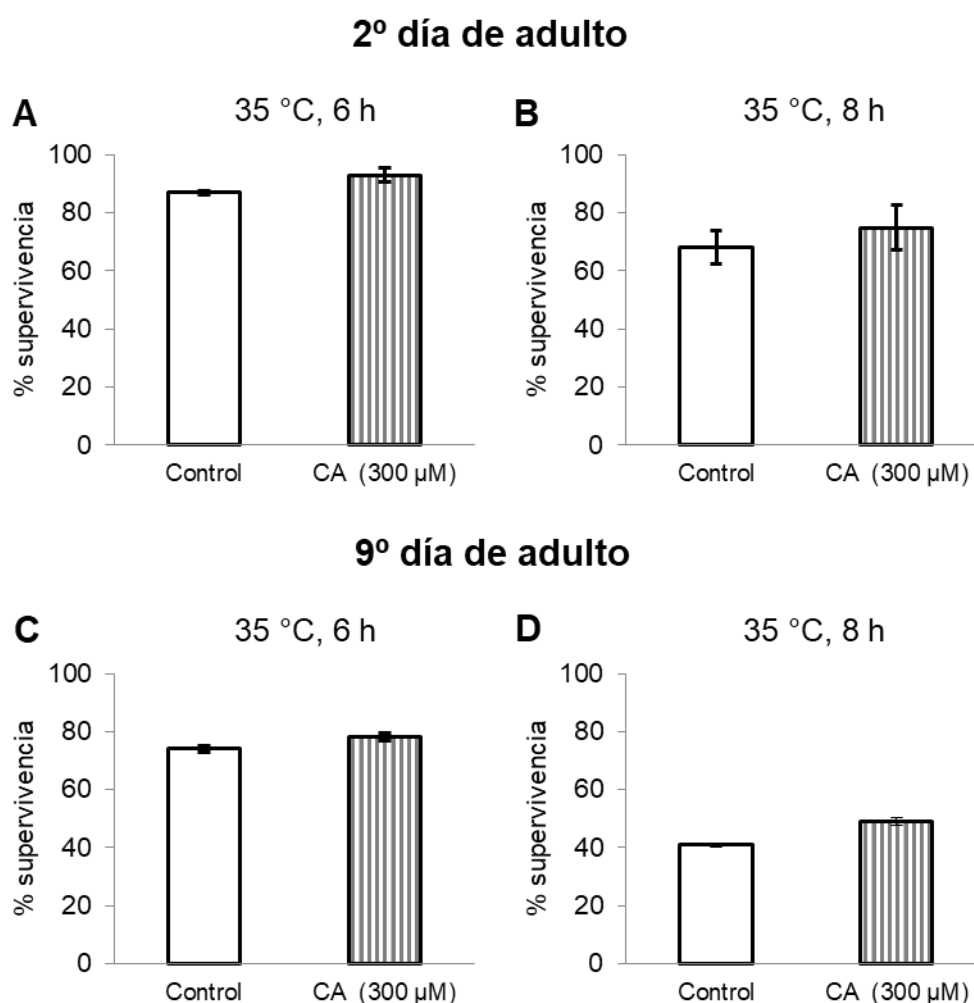
En la Figura IV.5.2 se recogen los porcentajes de supervivencia de los nematodos tratados con CA (200  $\mu\text{M}$ ) y control tras ser sometidos a estrés térmico durante 6 y 8 horas a 35 °C. Se puede comprobar que el tratamiento con CA inducía un aumento en la supervivencia en los gusanos tratados respecto al control, aunque la diferencia sólo era significativa en los gusanos de mayor edad (9º día de adulto), tanto tras un estrés de 6 h, donde el porcentaje de supervivencia pasó de un 81 % en gusanos control a un 91 % en los que habían sido cultivados en presencia del CA, como de 8 h donde se observó un 48 % de tasa de supervivencia en los nematodos control y un 60 % en el grupo tratado con CA (Figura IV.5.2, C y D). Estos resultados parecen sugerir que la capacidad de protección frente al estrés mejora por la exposición prolongada a CA.



**Figura IV.5.2.** Porcentajes de supervivencia de *C. elegans* sometidos a estrés térmico (35 °C) durante 6 h (A y C) u 8 h (B y D) en el segundo y noveno día de adulto, cultivados en ausencia (controles) o presencia de CA (200 µM). En cada caso se realizaron tres experimentos independientes (300 gusanos por grupo). Los resultados representan la media  $\pm$  SEM. La significación estadística se calculó usando la prueba Chi Cuadrado (\*\* $p < 0,01$  y \*\*\* $p < 0,001$ ).

En la Figura IV.5.3 se recogen los resultados obtenidos para los ensayos de estrés térmico de los nematodos tratados con 300 µM de CA. El tratamiento con el compuesto a esta concentración produjo un ligero aumento en la tasa de supervivencia de los gusanos respecto al control, que no fue significativo ( $p < 0,05$ ) en ninguno de los casos. El aumento en la tasa de supervivencia observado a la concentración 300 µM de CA es menor que el encontrado con 200 µM. Este resultado es similar al obtenido en el ensayo con PCA (apartado 4.2.1.1), donde

también se observaba la inducción de mayor resistencia a la concentración de 200  $\mu\text{M}$  que a 300  $\mu\text{M}$ .



**Figura IV.5.3.** Porcentajes de supervivencia de *C. elegans* sometidos a estrés térmico (35 °C) durante 6 h (A y C) u 8 h (B y D) en el segundo y noveno día de adulto, cultivados en ausencia (controles) o presencia de CA (300  $\mu\text{M}$ ). En cada caso se realizaron tres experimentos independientes (300 gusanos por grupo). Los resultados representan la media  $\pm$  SEM. La significación estadística se calculó usando la prueba Chi Cuadrado ( $p < 0,05$ ).

Pietsch et al. (2011) también describieron una mejora significativa en la termotolerancia en gusanos tratados con 200  $\mu\text{M}$  de CA cuando eran sometidos a estrés térmico (35 °C, 8 h), con un aumento en la tasa de supervivencia de aproximadamente un 12 % respecto al control. Estos mismos autores, estudiaron el efecto de concentraciones crecientes de CA (50 a 600  $\mu\text{M}$ ) sobre la longevidad

de *C. elegans*, encontrando que la exposición de los nematodos a concentraciones de 100 a 600  $\mu\text{M}$  (pero no a 50  $\mu\text{M}$ ) prolongaba significativamente la vida media, observándose el efecto más acusado con el tratamiento a 300  $\mu\text{M}$ . Parece, por tanto, que concentraciones de CA de 200-300  $\mu\text{M}$  en el medio de cultivo podrían encontrarse en el punto de inflexión a partir del cual comenzarían a declinar los efectos beneficiosos inducidos por este compuesto en *C. elegans*. De hecho, Pietsch et al. (2011) indican la existencia de una respuesta hormética a este compuesto, de manera que el aumento de su concentración acabaría por producir un efecto tóxico. La resistencia al estrés térmico podría estar mediada por proteínas de choque térmico (HSPs) (Parsell et al., 1993), chaperonas moleculares que mantienen la proteostasis al desestabilizar los agregados de proteínas y promover el plegamiento adecuado (Hartl, 1991; Pechan, 1991). En *C. elegans*, la regulación de la expresión de estas proteínas puede estar mediada por la ruta de señalización de la insulina (Hsu et al., 2003; Koch et al., 2014). En el mismo trabajo, Pietsch et al. (2011) evaluaron la influencia del CA sobre la expresión de diferentes proteínas de choque térmico (*hsp-3*, *hsp-12.6*, *hsp-16.1*, *hsp-16.41*, *hsp-17* y *hsp-70*), observando que producía una disminución en la expresión de cinco de las HSP y solamente un aumento, aunque no significativo, en la de *hsp-12.6*. Sin embargo, encontraron que el factor de transcripción DAF-16 y las proteínas SIR-2.1, OSR-1 (resistencia a estrés osmótico-1), UNK-43 (proteína quinasa II dependiente de  $\text{Ca}^{2+}$ /calmodulina (CaMKII)) y SEK-1 (ortólogo de MAP2K, que forma parte de la ruta MAP quinasa) eran necesarios para la mejora en la termotolerancia inducida por CA.

Havermann et al. (2014) estudiaron el efecto del éster fenilico del ácido cafeico (CAPE) en la supervivencia del nematodo tras la exposición durante 8 h a estrés térmico (37 °C) el día 5 de adulto. Estos autores encontraron que el tratamiento de *C. elegans* con 100  $\mu\text{M}$  de CAPE en el medio de cultivo aumentaba significativamente la termotolerancia de los gusanos. De modo similar, Zheng et al. (2017) evaluaron el efecto de otro derivado de ácido cafeico, el ácido clorogénico, a una concentración 50  $\mu\text{M}$ , sobre la resistencia frente al estrés oxidativo inducido térmicamente (35 °C) o químicamente con paraquat en

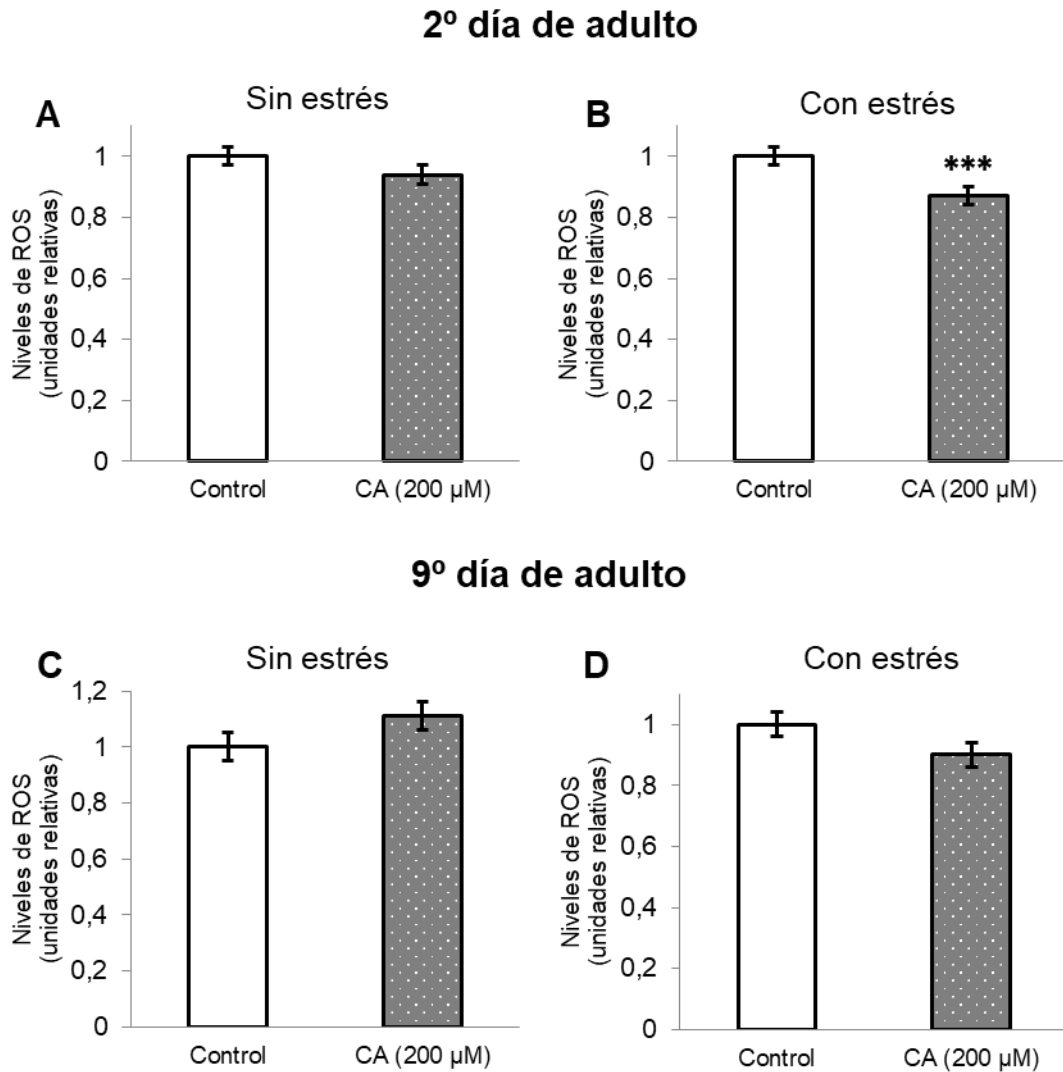
*C. elegans*, aplicado en el quinto día de adulto, observando un aumento significativo en la supervivencia de los nematodos tratados.

#### **4.5.2 Determinación de los niveles intracelulares de ROS con los reactivos DCFH-DA y MitoSOX**

Para continuar con el estudio de los efectos de CA en *C. elegans*, se determinaron los niveles intracelulares de ROS (con DCFH-DA) y los niveles de superóxido (con MitoSOX) en nematodos control y tratados con CA (200  $\mu$ M o 300  $\mu$ M), sometidos o no a estrés térmico (35 °C, 2 h), en el segundo y noveno día de adultos.

##### **a) Análisis de ROS totales con DCFH-DA**

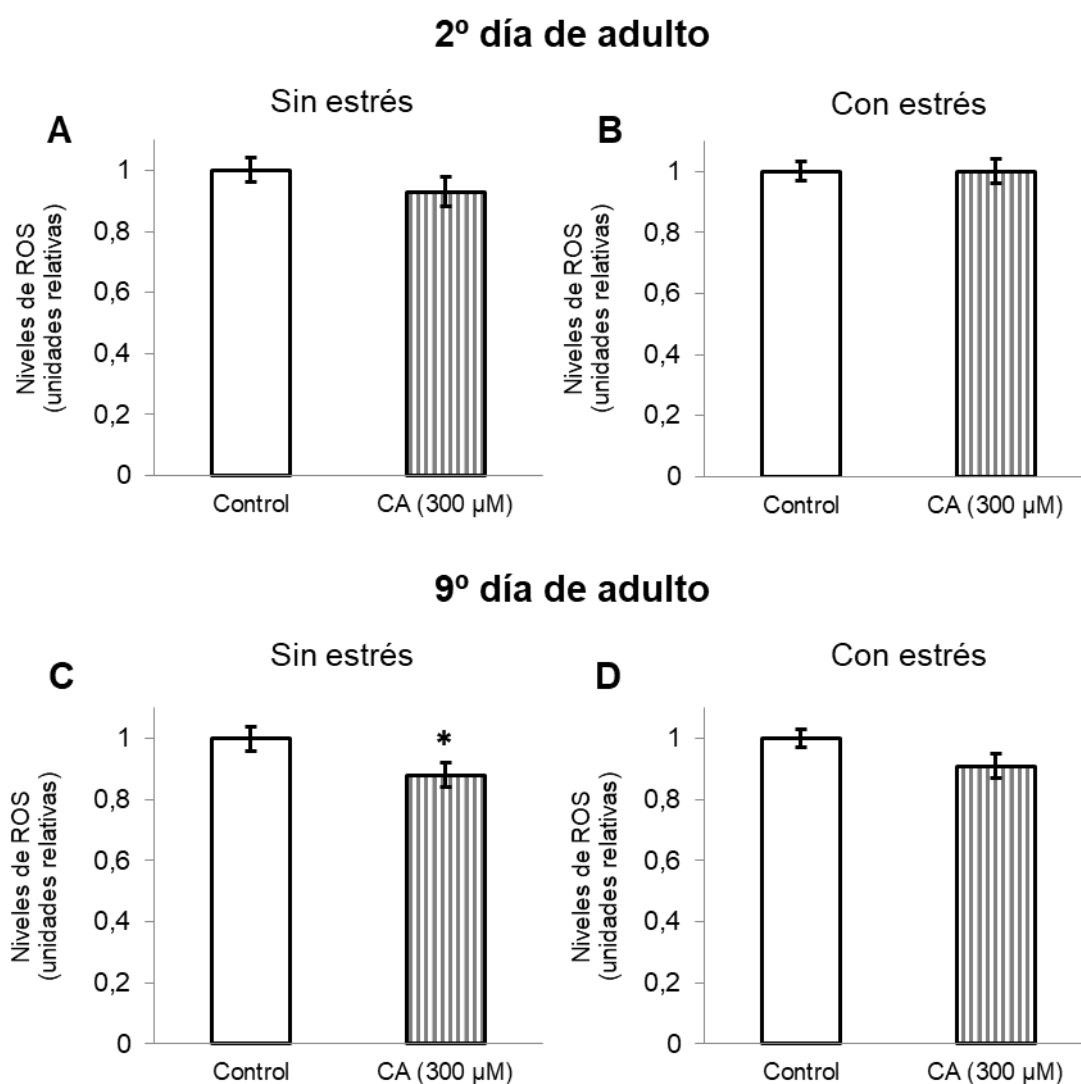
Como se puede observar en la Figura IV.5.4, las determinaciones realizadas el día 2 de adulto mostraron un descenso en los niveles de ROS en los nematodos tratados con CA (200  $\mu$ M) respecto al control, siendo significativa ( $p < 0,001$ ) en los gusanos sometidos a estrés térmico con un 13 % de disminución. De manera similar, Havermann et. al (2014) también encontraron que el éster fenetílico del CA era capaz de disminuir significativamente los niveles de ROS en nematodos en el día 2 de adulto sometidos a estrés térmico (35 °C), mientras que en condiciones basales no provocaba ningún cambio.



**Figura IV.5.4.** Niveles intracelulares relativos de ROS, determinados con DCFH-DA, en *C. elegans* en los días 2 y 9 de adulto, cultivados en presencia o ausencia de CA (200 μM), no sometidos (A y C) y sometidos a estrés térmico (B y D). En cada caso se realizaron tres experimentos independientes. Los resultados están normalizados respecto al control y representan la media  $\pm$  SEM. La significación estadística se calculó mediante ANOVA de un factor (\*\*\*)  $p < 0,001$ .

Sin embargo, en los ensayos realizados el día 9 de adulto no se observaron diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) entre los grupos control y tratados con CA, y existía un comportamiento aparentemente distinto entre los no sometidos a estrés térmico (aumento en los niveles de ROS en los nematodos tratados con CA) y los sometidos a estrés térmico (disminución de las ROS en los tratados con CA). Ciertamente las diferencias entre grupos control y tratados

no son significativas, por lo que quizás lo adecuado sería atribuir las mismas a la variabilidad biológica inherente a los organismos vivos.



**Figura IV.5.5.** Niveles intracelulares relativos de ROS, determinados con DCFH-DA, en *C. elegans* en los días 2 y 9 de adulto, cultivados en presencia o ausencia de CA (300 µM), no sometidos (A y C) y sometidos a estrés térmico (B y D). En cada caso se realizaron tres experimentos independientes. Los resultados están normalizados respecto al control y representan la media  $\pm$  SEM. La significación estadística se calculó mediante ANOVA de un factor ( $*p < 0,05$ ).

En la Figura IV.5.5 se recogen los resultados obtenidos para los niveles de ROS en los ensayos con CA 300 µM. Se puede observar que los gusanos tratados experimentaban, en todos los casos, una ligera disminución en los niveles de intracelulares de ROS respecto a sus controles, aunque la misma sólo



era significativa ( $p < 0,05$ ) en los gusanos no sometidos a estrés térmico estudiados en el 9º día adulto con un descenso del 12 %. Salvo por esta excepción, se puede considerar que la exposición a CA 300  $\mu\text{M}$  produce en *C. elegans* un efecto similar a CA 200  $\mu\text{M}$ , induciendo cierto descenso en los niveles de ROS, en general pequeño y no significativo.

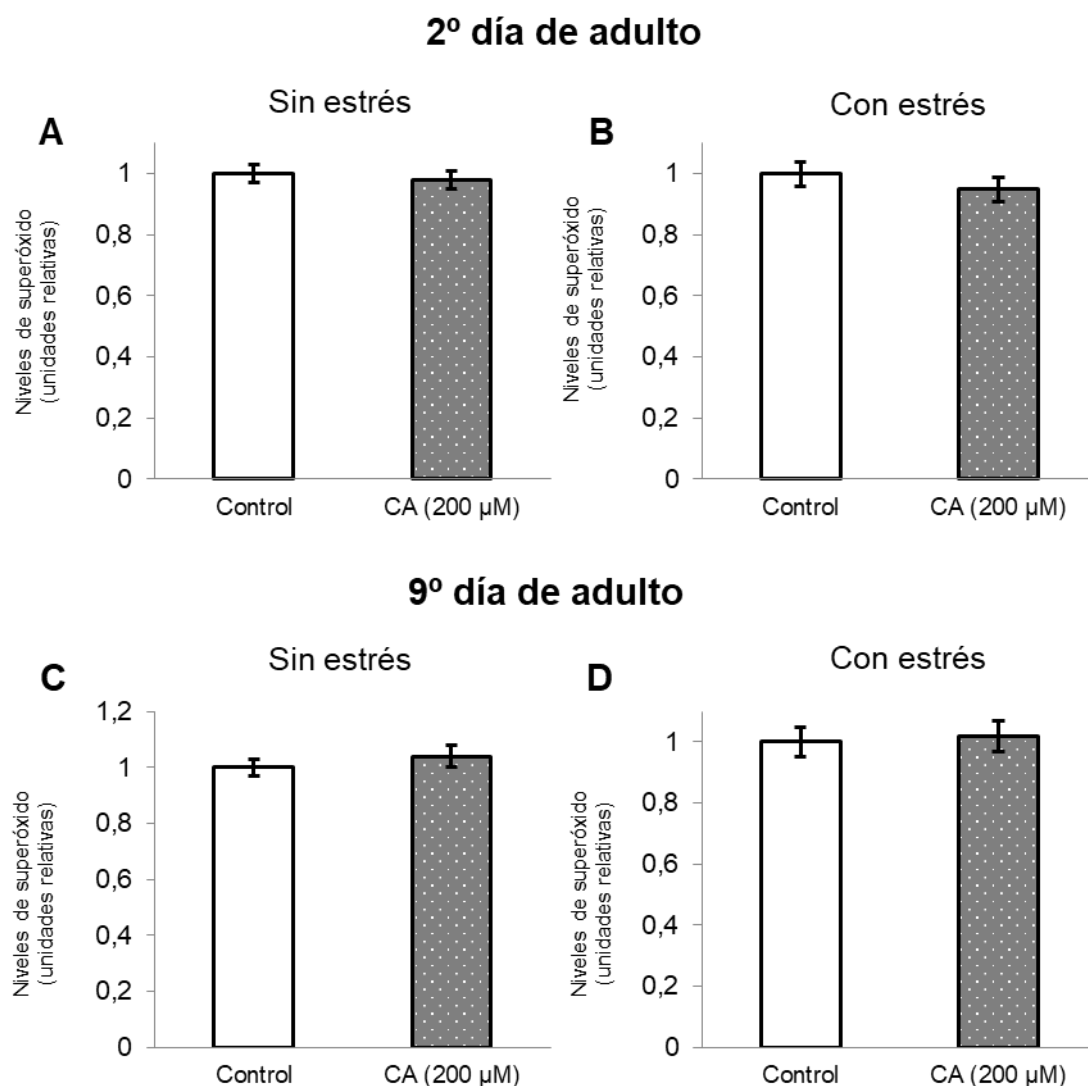
Los resultados obtenidos en el análisis de los niveles de ROS están, en general, en línea con los encontrados en los ensayos de resistencia a estrés térmico, en el sentido de que los descensos en las concentraciones de especies reactivas inducidos por el tratamiento con CA concuerdan con una tendencia de aumento en la termotolerancia.

En estudios *in vitro* se ha establecido que el CA posee una actividad antioxidante directa a través de la captación de ROS (Silva et al., 2000; Sroka y Cisowski, 2003; Dudylyna et al., 2019; Sugahara et al., 2018), y de la capacidad de quelar metales de transición prooxidantes (Borges et al., 2005). Asimismo, en estudios con líneas celulares e *in vivo*, con *Drosophila melanogaster*, se ha demostrado la capacidad de CA para inducir mecanismos relacionados con la mejora de la respuesta citoprotectora mediante la activación de factores de transcripción sensibles a estímulos redox y de regenerar las formas reducidas de antioxidantes endógenos (Ahn et al., 2017; Shen, J. et al., 2018; Dos Santos Nunes et al., 2019). No obstante, el efecto protector de los compuestos fenólicos no siempre se asocia a una disminución de ROS. En los estudios de Ayuda-Durán et al. (2019) realizados con el flavonoide epicatequina se encontraba un ligero aumento del nivel basal del ROS en los gusanos tratados junto a una mayor resistencia a estrés térmico, lo que se explicaba por una activación de mecanismos endógenos de defensa que protegen contra el daño oxidativo, inducida por la elevación en las ROS.

#### b) Determinación de niveles de superóxido con el reactivo MitoSOX

Debido a la mayor protección frente al estrés oxidativo observada en los ensayos de estrés térmico realizados con 200  $\mu\text{M}$  de CA, se decidió determinar los niveles de superóxido en *C. elegans* por el método MitoSOX en gusanos tratados con esa concentración de CA por si pudiera establecerse alguna

relación con el comportamiento encontrado en cuanto a resistencia a estrés con esta especie reactiva en particular.



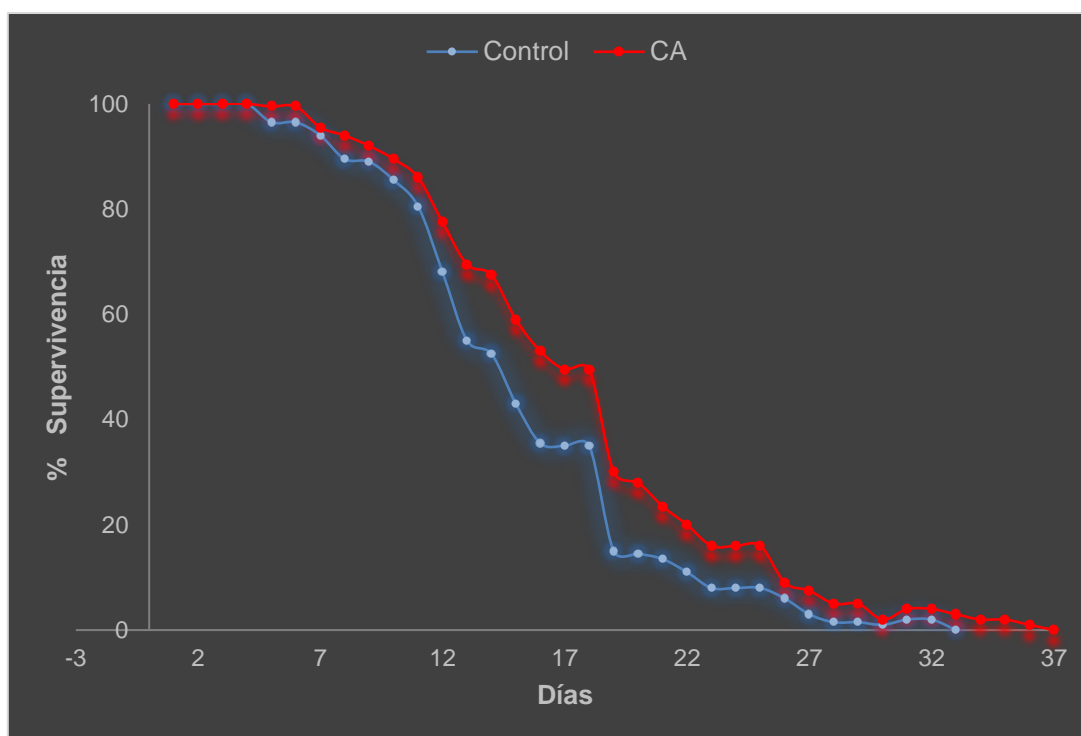
**Figura IV.5.6.** Niveles relativos de superóxido en *C. elegans* en los días 2 y 9 de adulto, cultivados en presencia o ausencia de CA (200 μM), no sometidos (A y C) y sometidos a estrés térmico (B y D). En cada caso se realizaron tres experimentos independientes. Los resultados representan la media ± SEM. La significación estadística se calculó mediante ANOVA de un factor ( $p < 0,05$ ).

Como se muestra en la Figura IV.5.6, el tratamiento con CA (200 μM) no produjo variaciones significativas ( $p < 0,05$ ) en las concentraciones de superóxido respecto al control, ni en presencia ni en ausencia de estrés, aunque se aprecia una ligera tendencia a la disminución en el ensayo realizado el día 2

y, por el contrario, al aumento en el realizado el día 9 de adulto. De todos modos, las diferencias no son significativas, por lo que aparentemente no se puede establecer una relación entre el tratamiento con CA y la producción particular de superóxido, ni tampoco entre los niveles de éste y el comportamiento encontrado en cuanto a resistencia a estrés térmico, que, como se recordará, aumentaba en los estudios en los gusanos tratados con CA en el 9º día de adulto. En este sentido, las pequeñas diferencias encontradas en las concentraciones de superóxido en los distintos ensayos podrían posiblemente considerarse en el contexto de la variabilidad intrínseca de los individuos.

#### 4.5.2 Estudios de longevidad

Para estos ensayos, gusanos sincronizados en estado larvario L1 eran transferidos a placas suplementadas con CA (200  $\mu$ M) hasta alcanzar el estado larvario L4. Una vez alcanzado este estado se transferían a placas nuevas también con el compuesto fenólico y a partir de este momento se comenzaba el recuento de gusanos supervivientes hasta muerte de toda la población. La Figura IV.5.7 muestra las curvas de supervivencia de los gusanos tratados con CA (200  $\mu$ M) y gusanos control crecidos en las mismas condiciones, pero sin presencia en el medio del ácido fenólico, y en la Tabla VI.5.1 se recogen los datos de vida media y máxima. Como se puede comprobar, el tratamiento con CA provocó un aumento significativo ( $p < 0,001$ ) en la vida media de *C. elegans* ( $19,0 \pm 0,47$  días), en comparación con el grupo control ( $16,4 \pm 0,39$  días). Además, también se encontró un incremento significativo ( $p < 0,01$ ) en la vida máxima, determinada como el 10 % de la población más longeva, de los gusanos tratados con CA ( $30,0 \pm 0,72$  días) respecto al grupo control ( $26,9 \pm 0,63$  días).



**Figura IV.5.7.** Curvas de supervivencia de *C. elegans* cultivados a 20 °C en ausencia (control) y presencia de CA (200  $\mu$ M).

**Tabla IV.5.1.** Influencia del CA (200  $\mu$ M) sobre la duración media y máxima de vida de *C. elegans* en condiciones normales de crecimiento a 20 °C. Los resultados representan la media  $\pm$  SEM (n = 3).

Tratamiento	Vida media (días)	p vs Control (Log-Rank)	Vida máxima 10 % (días)*	p vs Control (ANOVA)
Control	16,4 $\pm$ 0,39		26,9 $\pm$ 0,63	
CA (200 $\mu$ M)	19,0 $\pm$ 0,47	0,001	30,0 $\pm$ 0,72	0,009

\* Tiempo promedio de vida máximo del 10% de la población más longeva.

El efecto del CA sobre la longevidad en *C. elegans* también fue estudiado por Pietsch et al. (2011). De manera similar a nuestros resultados, esos autores observaron un aumento significativo en la vida media de *C. elegans* tratado con CA. En su caso, los ensayos fueron realizados para concentraciones de CA de 100 a 600  $\mu$ M, encontrando una respuesta dosis-dependiente, siendo el efecto más importante para una concentración 300  $\mu$ M, a la cual se obtenía un aumento del 11 % respecto al control, valor de un orden similar al encontrado en el

presente estudio (15 %) para una concentración de CA 200  $\mu\text{M}$ . Resultados semejantes en cuanto a aumento de duración de vida también fueron descritos por Havermann et al. (2014), donde encontraron un aumento significativo en la vida media de los nematodos tratados con CAPE (100  $\mu\text{M}$ ) de un 9 %, y un incremento en la vida máxima de un 17 %, respecto al control. Asimismo, Zheng et al. (2017) observaron que el tratamiento con 50  $\mu\text{M}$  de ácido clorogénico (ácido cafeoilquínico) producía una extensión en la vida media de un 20,1 % respecto al control. En todos esos estudios, los autores también encontraron que el tratamiento con el CA o sus derivados producía una mejora en la resistencia al estrés de los animales. De hecho, como ya se ha mencionado, se ha descrito que una mayor resistencia al estrés puede estar directamente relacionada con la longevidad (Zevian y Yanowitz, 2014).

Pietsch et al. (2011) estudiaron el efecto del CA sobre la duración de la vida de una cepa mutante de *C. elegans* (*mev-1*) hipersensible al estrés oxidativo y con una duración de vida reducida debido a la sobreproducción de ROS, encontrando que el CA aumentaba la vida media de la cepa mutante respecto al control. Igualmente, observaron que al menos otros cinco genes, *osr-1*, *sek-1*, *sir-2.1*, *unc-43* y *daf-16*, podían estar implicados en los efectos del CA sobre resistencia al estrés y envejecimiento.

Con el objeto de profundizar en los mecanismos moleculares subyacentes a los efectos del CA en *C. elegans*, se realizaron seguidamente análisis por RT-qPCR para evaluar la posible influencia de este ácido sobre la expresión de diversos genes relacionados, que en estudios con otros compuestos fenólicos se había visto que podían estar implicados en la respuesta a estrés oxidativo o longevidad.

#### **4.5.3 Estudio de los mecanismos moleculares implicados en los efectos biológicos del ácido cafeico**

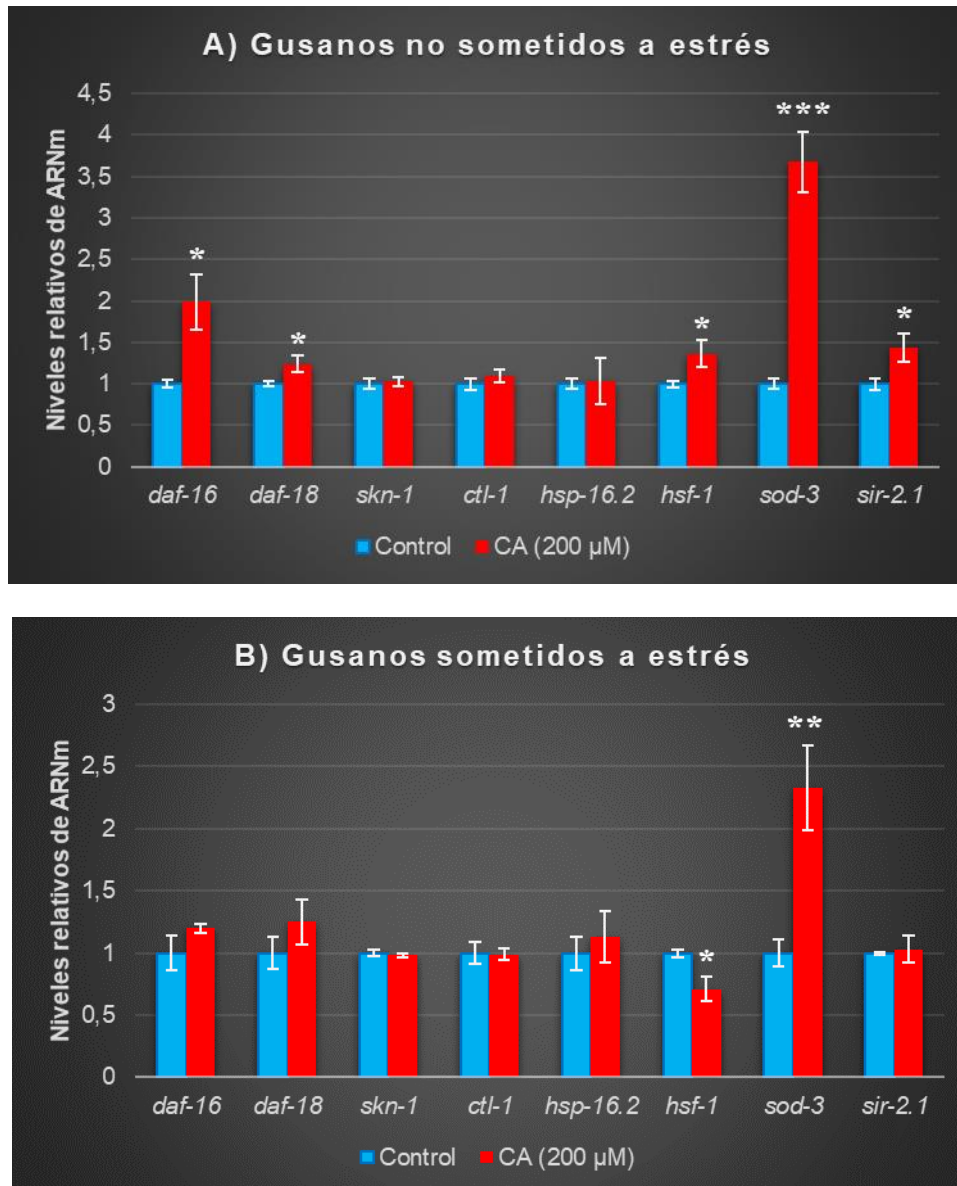
En la actualidad, la idea de que los compuestos fenólicos ejercen sus beneficios en la salud del organismo no solo actuando como antioxidantes convencionales, sino que también pueden modular múltiples rutas celulares, está extensamente aceptada (Mansuri et al., 2014).

La ruta de señalización de la insulina/IGF-1 (IIS) contribuye a la regulación de la longevidad y la respuesta al estrés oxidativo, comprendiendo factores altamente conservados desde los nematodos a los mamíferos (Murphy et al., 2003). Existe una amplia evidencia de que los compuestos fenólicos son capaces de modular esta ruta señalización, no obstante, continúan sin estar suficientemente esclarecidos los mecanismos moleculares implicados en los efectos beneficiosos de estos compuestos y, menos aún, de los metabolitos fenólicos colónicos.

Como se ha comentado en la introducción de esta tesis, factores ambientales, como puede ser la ingestión de alimento, generan una señal nerviosa que resulta en la liberación de uno o más péptidos similares a insulina (ILPs) (Braeckman y Vanfleteren, 2007). Estos péptidos pueden unirse al receptor DAF-2, un receptor tirosina quinasa homólogo del receptor de insulina/IGF-1 en *C. elegans*, que da como resultado el reclutamiento y la activación de AGE-1/PI3K. A su vez, se activan las serina/treonina quinazas (PDK-1, AKT-1 y AKT-2), lo que resulta en la fosforilación y, por tanto, la inactivación del factor de transcripción DAF-16/FOXO. La fosforilación de DAF-16/FoxO determina sus interacciones con las proteínas homólogas de la familia de proteínas 14-3-3 (PAR-5 y FTT-2), que controlan la localización subcelular de DAF-16/FoxO en el citoplasma. La fosfatasa lipídica DAF-18/PTEN y la serina/treonina fosfatasa PPTR-1/PP2A contrarrestan la señalización AGE-1/PI3K y AKT-1, respectivamente (Figura II.8, apartado 2.1.6.1) (Murphy y Hu, 2013). DAF-16/FoxO es el principal producto transcripcional de IIS, sin embargo, otros factores transcripcionales que participan en la regulación de la expresión del gen diana de DAF-16/FoxO también están regulados por IIS, como son HSF-1 y SKN-1. Los factores de transcripción DAF-16, HSF-1 y SKN-1 modulan la expresión de muchos genes diana relacionados con la longevidad, la tolerancia al estrés y la homeostasis proteica, como, por ejemplo, los genes de catalasa (*ctl-1*), de superóxido dismutasa-3 (*sod-3*), o de chaperonas moleculares (p.ej., *hsp-16.2*). Adicionalmente, DAF-16/FoxO interactúa con otros factores en el núcleo, como SIR-2.1 (Hsu et al., 2003; Murphy et al., 2003; Antebi, 2007).

En este trabajo se evaluó la expresión de varios genes relacionados con respuesta al estrés o envejecimiento, principalmente de la ruta IIS (*daf-16*, *daf-*

18, *skn-1*, *ctl-1*, *hsp-16.2*, *hsf-1* y *sod-3*) y un gen de sirtuinas (*sir-2.1*) mediante RT-qPCR en gusanos tratados previamente con CA (200  $\mu$ M) en condiciones normales de crecimiento y tras someterlos a estrés térmico (35 °C, 5 h). Los resultados obtenidos se resumen en la Figura IV.5.8.



**Figura IV.5.8.** Efecto del CA sobre la expresión de los genes *daf-16*, *daf-18*, *skn-1*, *ctl-1*, *hsp-16.2*, *hsf-1*, *sod-3* y *sir-2.1* en *C. elegans* cultivados en ausencia (controles) y presencia de CA (200  $\mu$ M), en gusanos no sometidos (A) y tras ser sometidos a estrés térmico (35 °C, 5 h) (B). El nivel de expresión fue determinado por RT-qPCR, empleando *act-1* como control interno. Se realizaron nueve experimentos independientes con los nematodos sin estrés (A) y tres experimentos independientes en los nematodos sometidos a estrés (B). Los resultados representan la media  $\pm$  SEM. La significación estadística se calculó mediante ANOVA de un factor (\* $p$  < 0,05, \*\* $p$  < 0,01 y \*\*\* $p$  < 0,001).

En *C. elegans*, *daf-16* codifica un factor de transcripción que es el único homólogo de FoxO en humanos. DAF-16 desempeña un papel clave en la mediación de IIS en sentido descendente, regulando procesos como crecimiento, control del ciclo celular, metabolismo, respuesta a estrés o longevidad (Accili y Arden, 2004). Como se puede observar en la Figura IV.5.8, A y B, los resultados mostraron que el tratamiento con CA producía un aumento en la expresión de *daf-16* respecto al control, aunque sólo era significativo ( $p < 0,05$ ) en los gusanos no sometidos a estrés. La sobreexpresión de DAF-16 observada en los nematodos expuestos a CA sugiere que este factor de transcripción podría jugar un papel esencial en los efectos producidos por CA sobre la longevidad y la resistencia al estrés en *C. elegans*. Esta suposición se ve reforzada por los resultados obtenidos por otros autores. Así, Pietsch et al. (2011), en estudios con mutantes carentes de función en *daf-16*, encontraron que este gen era necesario para los efectos sobre longevidad y resistencia a estrés térmico del CA. Por su parte, Havermann et al. (2014) estudiaron el efecto de un derivado de CA, CAPE, observando que el tratamiento de los gusanos con este compuesto aumentaba la translocación de DAF-16 al núcleo y que este factor era indispensable para la prolongación de la duración de vida inducida por el compuesto en *C. elegans*. Igualmente, Zheng et al. (2017) también concluyeron que este factor de transcripción era necesario para explicar los efectos beneficiosos relacionados con el envejecimiento producidos por otro derivado del CA, el ácido clorogénico, en ensayos con cepas mutantes de *C. elegans* y mediante la cuantificación de la expresión de genes por RT-PCR. Asimismo, en estudios realizados con distintos compuestos fenólicos o extractos vegetales ricos en éstos, se ha descrito la implicación de DAF-16 en los efectos favorables ejercidos por estos compuestos en *C. elegans* (Zhang et al., 2009; Bartholome et al., 2010; Martorell et al., 2011; Büchter et al., 2013; Chen et al., 2013; Peixoto et al., 2016; Xiong et al., 2018; Ayuda-Durán et al., 2019; Koch et al., 2019).

El gen *daf-18* codifica una fosfatasa lipídica homóloga al supresor humano tumoral PTEN, que en la ruta IIS contrarresta la actividad de AGE-1/PI3K, regulando negativamente la vía y desempeñando, por tanto, un papel importante en el metabolismo, desarrollo y longevidad (Mihaylova et al., 1999). Como se



puede observar en la Figura IV.5.8, al igual que para *daf-16*, el tratamiento con CA indujo un aumento en la expresión de *daf-18* respecto al control, que sólo era significativo ( $p < 0,05$ ) en los gusanos no sometidos a estrés térmico, sugiriendo también la participación de esta proteína en la actividad ejercida por CA en los nematodos.

No se encontraron diferencias en la expresión de los genes *skn-1* y *ctl-1* entre los grupos tratados con CA y control, ni en presencia ni en ausencia de estrés (Figura IV.5.8), sugiriendo que los mismos no son necesarios para explicar los efectos del CA en *C. elegans*. El gen *skn-1* codifica al homólogo del factor de transcripción Nrf-2, que promueve la resistencia a estrés oxidativo y la longevidad. Bajo condiciones de estrés, SKN-1 se activa a través de la translocación al núcleo, lo que induce la expresión de los genes involucrados en la respuesta de detoxificación de fase II (An et al., 2005; Blackwell et al., 2015). Havermann et al. (2014) tampoco encontraron que SKN-1 estuviera relacionado con la longevidad promovida por CAPE en *C. elegans*, ni observaron translocación al núcleo de este factor después del tratamiento con el compuesto. En estudios con quercetina (Saul et al., 2008; Pietsch et al., 2009) y con extractos fenólicos de arándanos (Wilson et al., 2006) se encontró que mutantes que carecían de este gen continuaban presentando un aumento en la duración de vida, concluyendo que SKN-1 no era necesario para explicar la longevidad inducida por esos compuestos.

El gen *ctl-1* codifica la enzima catalasa, que cataliza la conversión de  $H_2O_2$  a  $H_2O$  y a una molécula de oxígeno (Moreno-Arriola et al., 2014). Ayuda-Durán et al. (2019), al estudiar el efecto de epicatequina, tampoco encontraron aumento en la expresión de *ctl-1* en *C. elegans*, aunque sí de otros genes diana de DAF-16, como *hsp-16.2* y *hsp-70*.

Como se ha comentado anteriormente, una respuesta de defensa frente a las altas temperaturas y otras formas de estrés es la inducción de proteínas de choque térmico. Estas incluyen HSP-100, HSP-90, HSP-70, HSP-60, HSP-40, HSP-30 y las HSP pequeñas (sHSP) (Kim et al., 1998). Algunas HSP, predominantemente las chaperonas dependientes de ATP de las familias HSP-70 y HSP-90, muestran una expresión constitutiva y tienen roles en el desarrollo, así como en la respuesta al estrés (Snutch et al., 1988; Heschl y Baillie, 1989).

Otras HSP, principalmente las sHSP de la familia de las HSP-16, son inducidas y funcionan durante estrés térmico u oxidativo (Schlesinger, 1990). Las chaperonas moleculares, a las que pertenece HSP-16.2, son dianas transcripcionales de DAF-16 y HSF-1 (Hsu et al., 2003). En el presente trabajo, se cuantificó la expresión de *hsp-16.2*, para la cual no se observaron diferencias significativas en los gusanos tratados con CA respecto a los controles en presencia ni ausencia de estrés térmico (Figura IV.5.8). Pietsch et al. (2011) evaluaron la expresión de diferentes HSP (*hsp-3*, *hsp-12.6*, *hsp-16.1*, *hsp-16.41*, *hsp-17* y *hsp-70*), observando que el tratamiento con CA conducía una disminución en la expresión de cinco de las HSP, siendo significativo para tres de ellas y solamente el aumento de *hsp-12.6*, aunque no significativo. Los resultados obtenidos e información previa disponible no permiten concluir definitivamente sobre el papel de las chaperonas moleculares en los efectos del CA en *C. elegans*. Hay que tener en cuenta que, en este trabajo, el análisis se restringió a un gen específico y que existen diversos genes de este grupo, cuyo comportamiento podría variar.

Se llevaron a cabo estudios similares con *hsf-1*, que codifica al factor de transcripción de choque térmico HSF-1 en *C. elegans*, que regula la expresión de genes de diversas chaperonas moleculares y proteasas en respuesta al calor y otras formas de estrés (Hsu et al., 2003). Además, HSF-1 también influye en la citoprotección, longevidad, metabolismo y desarrollo (Brunquell et al., 2016). Se encontró que el tratamiento con CA aumentaba significativamente ( $p < 0,05$ ) la expresión de *hsf-1* en gusanos en condiciones normales de crecimiento, indicando que es capaz de activar este factor de transcripción. Sin embargo, de manera opuesta, el tratamiento con CA condujo a una disminución, también significativa, en la expresión de *hsf-1* cuando los gusanos eran posteriormente sometidos a estrés (Figura IV.5.8). En estudios sobre cepas mutantes de *C. elegans*, Zheng et al. (2017) describieron una implicación parcial de HSF-1 en el aumento de la duración de vida inducido por el ácido clorogénico, ya que se seguía observando un incremento (no significativo) en la extensión de vida en los nematodos mutantes. HSF-1 es necesario para el aumento de la duración de vida asociado con varios mecanismos de regulación de la longevidad, como la ruta de señalización de la insulina, de mTOR y la restricción calórica, siendo un

factor importante en condiciones fisiológicas sin estrés y su sobreexpresión promueve la longevidad en *C. elegans*. Sin embargo, los mecanismos a través de los cuales actúa no están totalmente descritos (Hsu et al., 2003; Morley y Morimoto, 2004; Steinkraus et al., 2008; Seo et al., 2013). Por lo tanto, con esta información se podría explicar que en condiciones sin estrés aumente su expresión y en condiciones de estrés térmico agudo no se observe un aumento. Pese que se ha descrito que el aumento de la supervivencia asociado con la sobreexpresión de HSF-1 se debe, al menos en parte, a la regulación de la expresión de las proteínas de choque térmico (Hsu et al., 2003), estudios posteriores encontraron que la sobreexpresión de una forma modificada de HSF-1 en una cepa transgénica de *C. elegans* extendía la vida media del nematodo sin afectar su capacidad para desencadenar la expresión de las HSP (Baird et al., 2014). Además, también se ha descrito que la activación de HSF-1 es capaz de promover la supervivencia en un modelo de neurodegeneración murino sin inducir mayor expresión de HSP en tejido cerebral (Fujimoto et al., 2005). En su conjunto, estos trabajos sugieren que el aumento en la duración de vida asociada con una mayor actividad de HSF-1 en animales no estaría sólo relacionada con la regulación positiva de genes de respuesta de choque térmico, como es *hsp-16.2*, sino que presumiblemente también podría implicar la regulación transcripcional de otras dianas no identificadas de HSF-1. Además, el potencial de transactivación de HSF-1 puede estar limitado por varios mecanismos reguladores, como pueden ser proteínas inhibitorias como son AKT, la proteína de unión al factor HSF-1 (HSB-1), DDL-1, DDL-2 o quinasa ligada a las integrinas (PAT-4/ILK), que dictarían el estado de activación dependiente del contexto de la proteína HSF-1 (Anckar y Sistonen, 2011; Chiang et al., 2012; Kumsta et al., 2014; Carpenter et al., 2015; Gomez-Pastor et al., 2018). Para entender la disminución en la expresión de HSF-1 en los nematodos tratados con CA y sometidos a estrés térmico es necesario, por tanto, continuar profundizando en este sentido, ampliando el estudio a otros genes relacionados.

El gen *sod-3* codifica en *C. elegans* la enzima ortóloga SOD2 en humanos, que posee actividades de homodimerización de proteínas y superóxido dismutasa, estando involucrada en la eliminación de radicales superóxido (Moreno-Arriola et al., 2014). En la Figura IV.5.8 se puede observar que el

tratamiento con CA condujo a un importante aumento significativo en la expresión de *sod-3* en los gusanos tanto en ausencia ( $p < 0,001$ ) como en presencia de estrés térmico ( $p < 0,01$ ).

Similar a nuestros resultados, diferentes trabajos con flavonoides o extractos vegetales ricos en estos han descrito un aumento en la expresión de *sod-3* inducido por el tratamiento con estos compuestos fenólicos en *C. elegans* (Zhang et al., 2009; Bartholome et al., 2010; Xiong et al., 2014 y 2018; Peixoto et al., 2016). El gen *sod-3* es una diana directa de DAF-16, ya que el promotor de *sod-3* posee elementos de unión a DAF-16/FoxO (DBEs) (Furuyama et al., 2000), por lo tanto, el aumento en la expresión del gen de SOD-3 podría estar relacionado con el incremento en la expresión de DAF-16 observado en el presente trabajo. De igual manera, en estudios con epigallocatequina-3-O-galato se ha descrito la implicación de DAF-16 en el aumento de la expresión *sod-3* (Bartholome et al., 2010; Xiong et al., 2018). Por otro lado, Cabreiro et al. (2011) observaron que la sobreexpresión de la isoforma de SOD citosólica, *sod-1*, aumentaba la duración de la vida de *C. elegans* y que ésta, no estaba relacionada con la reducción de la oxidación lipídica. De hecho, encontraron que los niveles de oxidación de proteínas aumentaban en estos gusanos y que el efecto de la sobreexpresión de SOD-1 sobre el aumento en la duración de la vida se debía a la activación de factores transcripcionales DAF-16 y HSF-1. De manera similar, la sobreexpresión del gen de la isoforma SOD-2 también aumentaba la longevidad de los gusanos de manera dependiente de DAF-16. Esos autores sugirieron que no la captación del superóxido sino la sobreexpresión de SOD-1 para la que podía desencadenar una respuesta al estrés dependiente de DAF-16 y HSF-1 que prolonga la vida.

Todos estos antecedentes podrían explicar en cierta forma que en nuestro estudio no se observe disminución en los niveles de superóxido (Figura IV.5.6), a pesar de la sobreexpresión de *sod-3*, aunque si un aumento en longevidad (Tabla IV.5.1 y Figura IV.5.7) y en la resistencia al estrés oxidativo (Figura IV.5.2). Serían, sin embargo, necesarios más estudios para confirmar lo anterior.

En *C. elegans*, *sir-2.1* codifica la sirtuina homóloga de SIRT1 en mamíferos, que responde a los cambios metabólicos en el entorno celular, incluida la disponibilidad de nutrientes, energía y estrés celular (Viswanathan y

Tissenbaum, 2013). Los análisis mediante RT-qPCR demostraron que el tratamiento con CA aumentaba significativamente ( $p < 0,05$ ) la expresión de *sir-2.1* cuando no era sometido a estrés, mientras que no se observaba diferencias tras aplicación de estrés térmico (Figura IV.5.8). En este sentido, se ha evidenciado que la sobreexpresión de *sir-2.1* en *C. elegans* aumenta la vida media, sugiriendo que es un modulador conservado del envejecimiento en el organismo, y que esta extensión de la longevidad requiere DAF-16/FoxO (Tissenbaum y Guarente, 2001). Posteriormente, Berdichevsky et al. (2006) describieron que SIR-2.1 y las proteínas PAR-5 y FTT-2, homólogas de 14-3-3 en *C. elegans*, podrían actuar paralelamente a IIS en una ruta dependiente de estrés activando DAF-16 y, por lo tanto, extendiendo la duración de vida.

Similar a lo observado en el presente trabajo, Pietsch et al. (2011) describieron que el factor SIR-2.1 era necesario para el aumento en la duración de vida y la mejora en la termotolerancia inducidos por CA en *C. elegans*. Además, estos autores observaron un efecto positivo en la duración de vida con el tratamiento de CA en mutantes que carecían de *daf-2* y *age-1*, lo que significaría que estos genes no estarían involucrados en el efecto del CA. Esto les llevó a concluir que el CA podría ejercer sus efectos a través de una ruta independiente de IIS, y que promovería la longevidad por medio de una vía de respuesta al estrés dependiente de SIR-2.1. Sunagawa et al. (2011) también observaron que la extensión de la longevidad en *C. elegans* inducida por un extracto de manzanas, rico en procianidinas era dependiente de SIR-2.1.

La observación de la existencia de una relación entre SIR-2.1 y la ruta de IIS, o específicamente DAF-16, en los mecanismos de acción de los compuestos fenólicos en *C. elegans* difiere según los estudios. En nematodos tratados con una preparación de cacao, rica en catequinas y procianidinas, a diferencia de lo observado con CA (Pietsch et al., 2011), encontraron que tanto DAF-16 y DAF-2 (ruta IIS) como SIR-2.1 se encontraban implicados en los efectos beneficiosos sobre la duración de vida y el estrés oxidativo producidos por esos compuestos (Martorell et al., 2011). Xiong et al. (2014) describieron que el tratamiento con extracto de té negro en *C. elegans* aumentaba la expresión de *sir-2.1* y *sod-3*, aunque no de *daf-16*. Además, observaron que los efectos protectores inducidos por el extracto frente a estrés térmico y por radiación UV dependían de la

expresión de SIR-2.1. Sin embargo, posteriormente, Xiong et al. (2018) encontraron que el tratamiento de *C. elegans* con epigallocatequina-3-O-galato provocaba un aumento de la duración de vida que dependía de AAK-2, SIR-2.1 y DAF-16.

El conjunto de resultados obtenidos en el presente trabajo indicaría que en el efecto favorable del CA sobre estrés oxidativo y longevidad podrían estar implicados genes relacionados con ruta IIS, como *daf-16*, *daf-18*, *hsf-1* y *sod-3*, así como un gen de sirtuinas (*sir-2.1*).

#### 4.5.3 Conclusiones parciales

El tratamiento con CA (200  $\mu$ M y 300  $\mu$ M) induce un aumento en la supervivencia de *C. elegans* en gusanos sometidos a estrés térmico, aunque sólo de manera significativa en gusanos de mayor edad (9<sup>o</sup> día de adulto) y para una concentración 200  $\mu$ M de CA en el medio de cultivo. Este resultado parece sugerir que la capacidad de protección frente al estrés mejora por la exposición prolongada a CA, pero no necesariamente con el aumento en la concentración de este ácido fenólico. La exposición a CA (200  $\mu$ M) también conduce a un aumento significativo en la vida media ( $19,0 \pm 0,47$  días) y máxima ( $30,0 \pm 0,72$  días) de *C. elegans*, en comparación con el grupo control no tratado ( $16,4 \pm 0,39$  días y  $26,9 \pm 0,63$  días, respectivamente).

En líneas generales, el tratamiento con CA lleva a una reducción en las concentraciones de ROS, aunque no siempre significativa, planteando la duda de si las variaciones del nivel de especies reactivas, dentro de las pequeñas oscilaciones observadas, son realmente importantes para explicar la mejora en la resistencia al estrés producida por este compuesto.

Estudios de expresión génica realizados por RT-qPCR pusieron de manifiesto que los efectos favorables del CA sobre estrés oxidativo y longevidad podrían implicar la activación de varios genes relacionados con ruta de la insulina/IGF-1, como *daf-16*, *daf-18*, *hsf-1* y *sod-3*, así como un gen de sirtuinas (*sir-2.1*). Sin embargo, la disminución significativa de la expresión de *hsf-1* en los gusanos sometidos a estrés térmico, ponen en duda el papel que desarrolla este factor de transcripción en condiciones de estrés térmico y, podría indicar la participación de otros mecanismos diferentes a los estudiados en el presente

trabajo inducidos por el CA, campo en el que se podría profundizar en futuras aproximaciones. Especialmente destacado es el aumento inducido por el CA en la expresión del gen *sod-3*, que codifica en *C. elegans* una enzima ortóloga de SOD2 en humanos con actividad superóxido dismutasa, lo que se podría esperar que facilitara la eliminación de radicales superóxido. No obstante, en los análisis de superóxido realizados con el reactivo MitoSOX, no se encontró una reducción en los niveles de esta especie reactiva en los gusanos tratados con CA, por lo que habría que evaluar las implicaciones reales del aumento en la expresión del gen *sod-3* sobre los efectos observados.

#### 4.6 Estudios con ácido dihidrocafeico

El ácido dihidrocafeico (ácido 3-(3,4-dihidroxifenil)-propiónico, DHCA) (Figura IV.6.1) es uno de los metabolitos microbianos más importantes de los ácidos clorogénicos, alcanzando concentraciones en plasma de orden micromolar 5-10 h después de la ingesta de estos ácidos fenólicos (Stalmach et al., 2009; Renouf et al., 2010). Tiene una vida media larga en el organismo, ya que se ha observado en orina 48 h después de una dosis única de café y una dieta posterior sin compuestos fenólicos (Duarte y Farah, 2011). Además, también se ha identificado en orina de voluntarios después de una dieta rica en catequinas, antocianos y proantocianidinas (Olthoff et al., 2003; Rios et al., 2003; Pimpão et al., 2014; Sasot et al., 2017).

Diferentes estudios *in vitro* han demostrado para el DHCA capacidad antioxidante (Huang et al., 2004; Poquet et al., 2008; Baeza et al., 2016; Hu et al., 2018; Wang et al., 2019), antiinflamatoria (Poquet et al., 2008; Hu et al., 2018) y anticancerígena (Miene et al., 2011); así como un efecto de neuroprotección tanto *in vitro* (González-Sarrías et al. 2017) como *in vivo* (Lee et al., 2015).

En este apartado se evalúan los efectos del DHCA en cuanto a resistencia oxidativa inducida térmicamente, niveles de ROS y de superóxido, y longevidad, y se exploran los mecanismos moleculares que podrían estar implicados en estos efectos, utilizando como organismo modelo *C. elegans*.

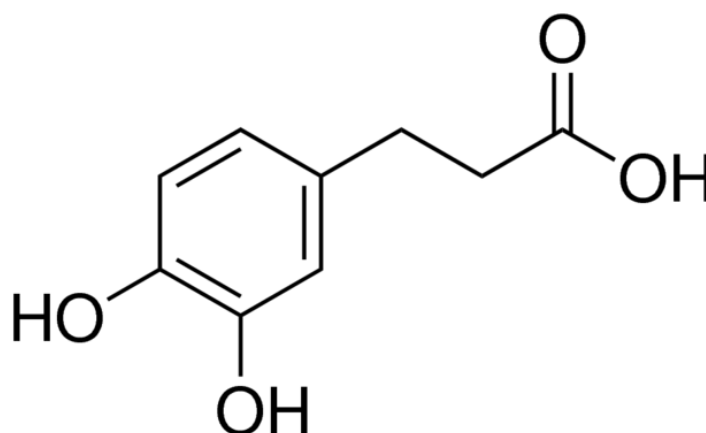


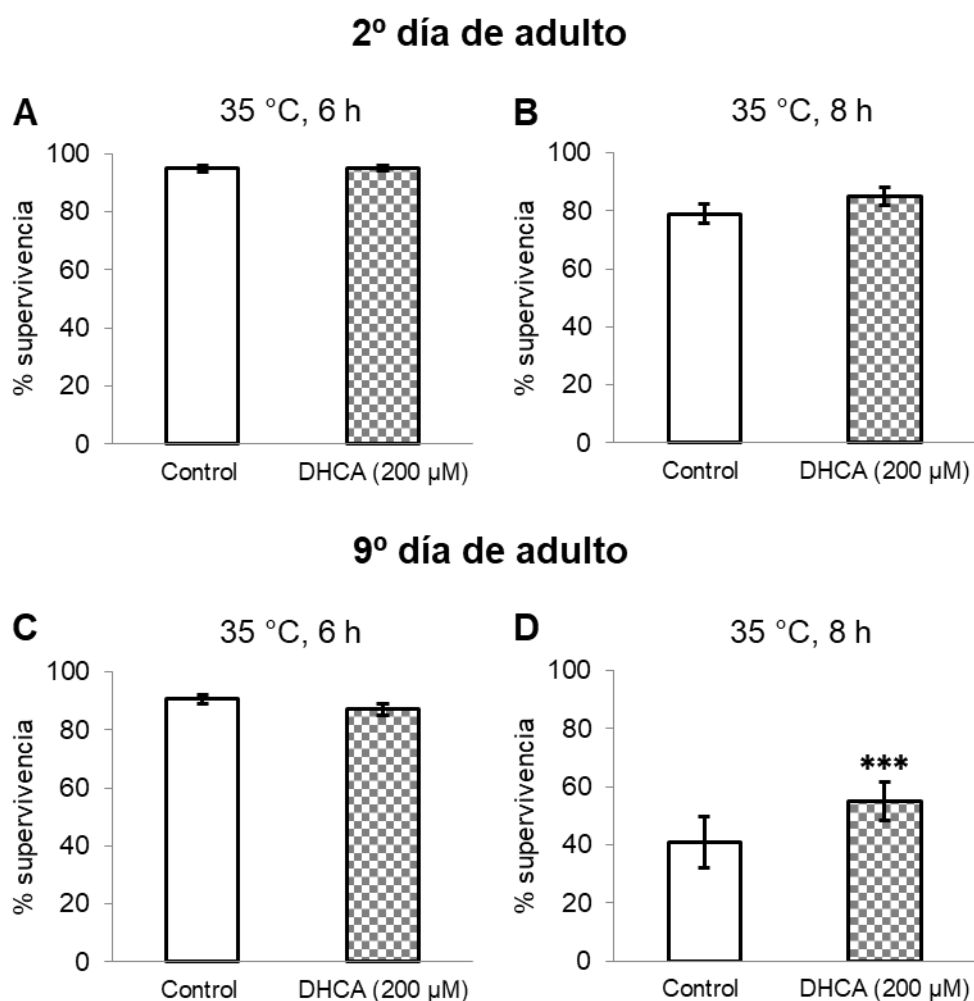
Figura IV.6.1. Estructura del ácido dihidrocafeico.



#### **4.6.1 Ensayos de estrés térmico**

El objetivo del ensayo era comprobar si los gusanos previamente tratados con DHCA mejoraban su resistencia frente al estrés oxidativo inducido térmicamente. Los ensayos se realizaron utilizando una concentración en el medio de cultivo de 200  $\mu\text{M}$  y 300  $\mu\text{M}$  del compuesto. La aplicación del estrés se realizó en dos estados de desarrollo del nematodo: segundo y noveno día de adulto. Los nematodos eran cultivados en medio NGM que contenía DHCA desde que entraban en la fase larvaria L1 hasta el día del ensayo, en que eran sometidos a una temperatura de 35 °C durante 6 y 8 h, para después comparar su tasa de supervivencia con la de una población control de nematodos sometida a las mismas condiciones de estrés, pero cultivada en ausencia del compuesto.

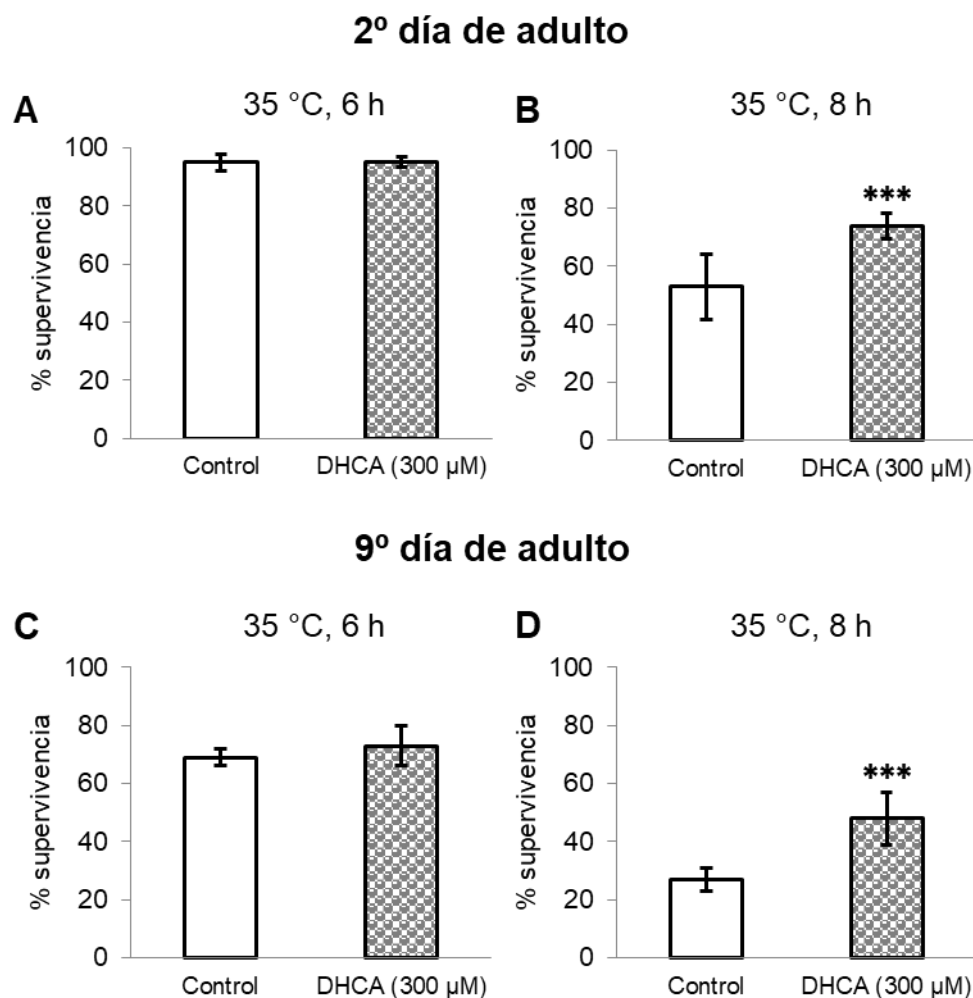
En la Figura IV.6.2 se muestran los porcentajes de supervivencia de los nematodos tratados con DHCA (200  $\mu\text{M}$ ) y control tras ser sometidos a estrés térmico durante 6 u 8 horas a 35 °C. Se puede observar que el tratamiento con el compuesto no tuvo efecto significativo ( $p < 0,05$ ) sobre los gusanos adultos jóvenes (día 2), mientras que en los adultos en etapa post-reproductiva (día 9) se producía una mejora significativa ( $p < 0,001$ ) en la resistencia al estrés (35 °C, 8 h) tras ser tratados con DHCA, respecto al control.



**Figura IV.6.2.** Porcentajes de supervivencia de *C. elegans* sometidos a estrés térmico (35 °C) durante 6 h (A y C) u 8 h (B y D) en el segundo y noveno día de adulto, cultivados en ausencia (controles) o presencia de DHCA (200 µM). En cada caso se realizaron tres experimentos independientes (300 gusanos por grupo). Los resultados representan la media  $\pm$  SEM. La significación estadística se calculó usando la prueba Chi Cuadrado (\*\*\*)  $p < 0,001$ ).

El tratamiento de *C. elegans* con una concentración 300 µM de DHCA en el medio de cultivo ofreció mejores resultados, ya que condujo a una mayor resistencia al estrés tanto en gusanos jóvenes como envejecidos, siendo el aumento significativo ( $p < 0,001$ ) en el caso del estrés térmico más prolongado (35 °C, 8 h) respecto al control (Figura IV.6.3). En el segundo día de adulto con un estrés de 8 h se observó que el porcentaje de supervivencia de *C. elegans* pasó de un 53 % en los gusanos sin tratamiento a un 74 % en los tratados previamente con DHCA (Figura IV.6.3, B), y en el día 9 de adulto a las 8 h de

estrés térmico la tasa de supervivencia de los nematodos sin tratamiento fue de un 27 %, mientras que la de los tratados con DHCA fue de un 48 % (Figura IV.6.3, D).



**Figura IV.6.3.** Porcentajes de supervivencia de *C. elegans* sometidos a estrés térmico (35 °C) durante 6 h (A y C) u 8 h (B y D) en el segundo y noveno día de adulto, cultivados en ausencia (controles) o presencia de DHCA (300 µM). En cada caso se realizaron tres experimentos independientes (300 gusanos por grupo). Los resultados representan la media  $\pm$  SEM. La significación estadística se calculó usando la prueba Chi Cuadrado (\*\*\*)  $p < 0,001$ .

De manera general, los resultados obtenidos en cuanto a mejora de la termotolerancia producida por el DHCA son similares a los encontrados en los ensayos con ácido cafeico (ver apartado 4.5.1), aunque en ese caso se

obtuvieron efectos más favorables para una concentración en el medio de cultivo de 200  $\mu\text{M}$  que para 300  $\mu\text{M}$ .

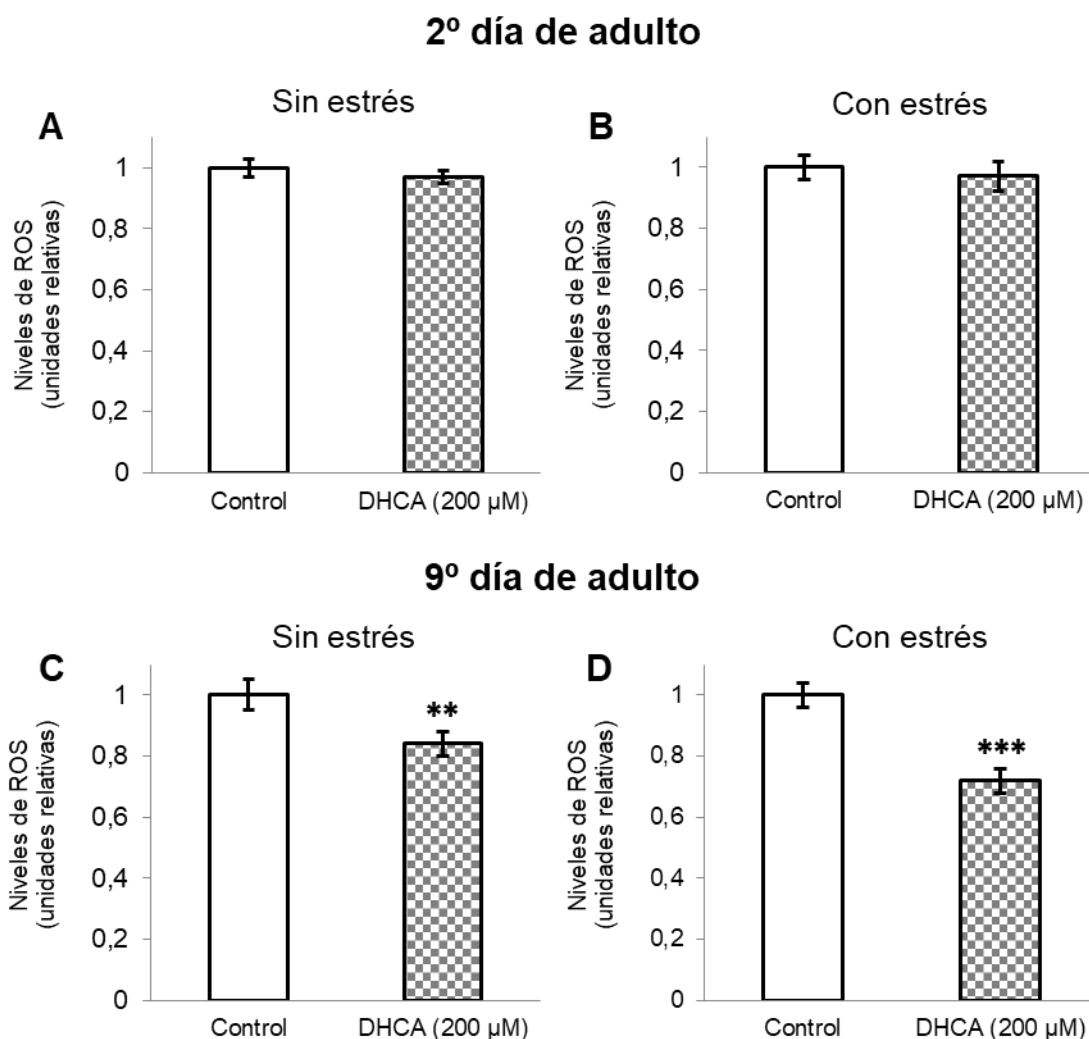
Según nuestro conocimiento, no existen estudios previos sobre los efectos del DHCA en la resistencia al estrés oxidativo en *C. elegans*. Como ya se ha discutido en el apartado 4.5.1, hay algunos trabajos realizados con compuestos fenólicos relacionados, como ácido cafeico (Pietsch et al., 2011), CAPE (Havermann et al., 2014) o ácido clorogénico (Zheng et al., 2017), encontrando que el tratamiento de *C. elegans* con concentraciones de estos compuestos del mismo orden a las aquí ensayadas para DHCA producía un aumento significativo en la resistencia de los nematodos frente al estrés oxidativo inducido térmica o químicamente, en línea con lo observado en nuestro estudio.

#### **4.6.2 Determinación de los niveles intracelulares de ROS con los reactivos DCFH-DA y MitoSOX**

Se determinaron los niveles intracelulares de ROS en nematodos control y nematodos previamente tratados con DHCA (200  $\mu\text{M}$  o 300  $\mu\text{M}$ ), sometidos o no a estrés térmico (35 °C, 2 h), en el segundo y noveno día de adultos.

##### **a) Análisis de ROS totales con DCFH-DA**

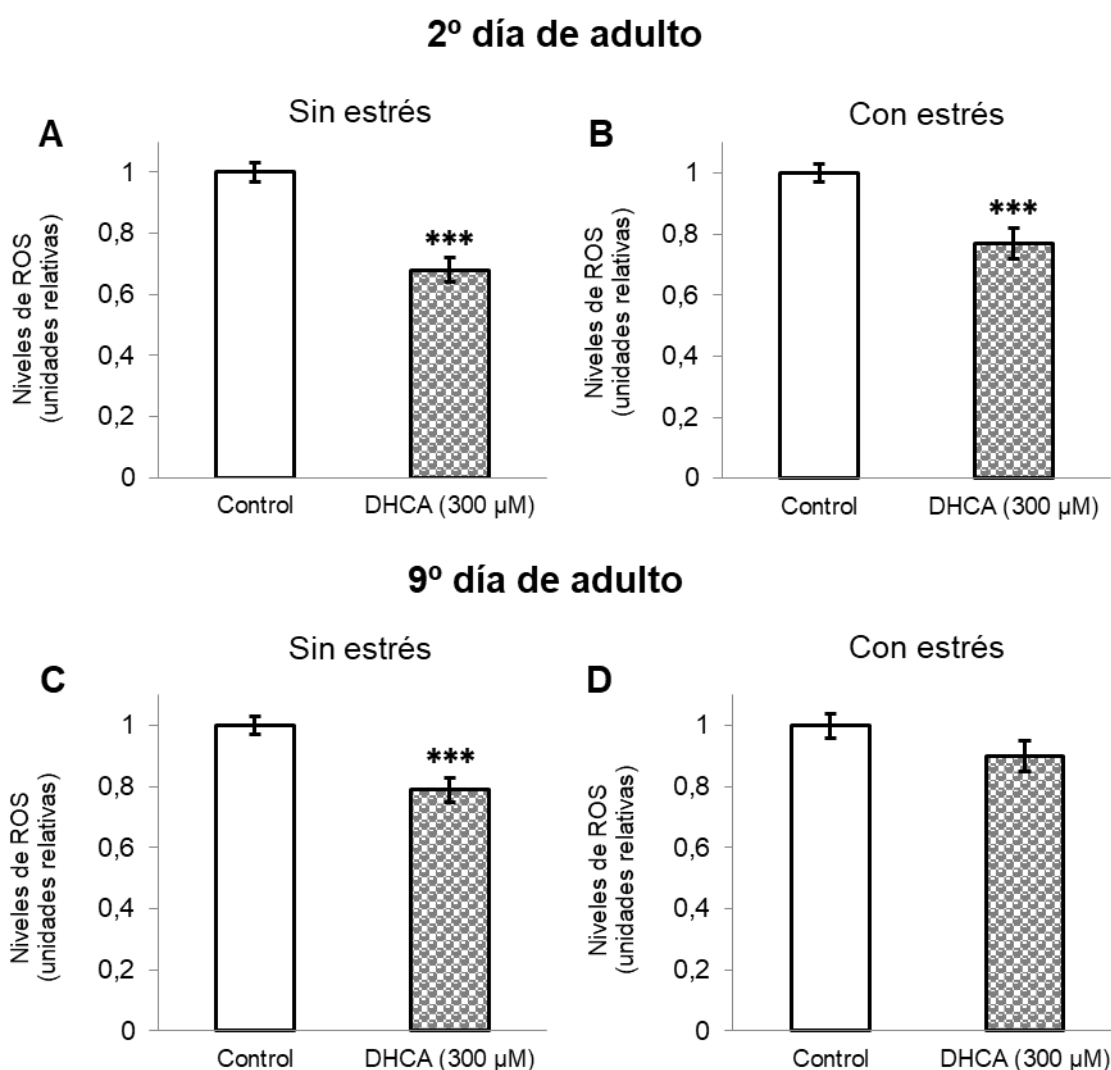
Como se puede observar en la Figura IV.6.4, los niveles de ROS totales determinados el día 2 de adulto no mostraron ninguna diferencia significativa entre los gusanos control y los gusanos tratados con DHCA (200  $\mu\text{M}$ ). Sin embargo, en el día 9 de adulto se observó que el tratamiento con DHCA (200  $\mu\text{M}$ ) disminuía significativamente los niveles de ROS, tanto en el grupo sometido (descenso del 28 %;  $p < 0,001$ ) como en el no sometido a estrés térmico (descenso del 16 %;  $p < 0,01$ ), respecto a los controles respectivos.



**Figura IV.6.4.** Niveles intracelulares relativos de ROS, determinados con DCFH-DA, en *C. elegans* en los días 2 y 9 de adulto, cultivados en presencia o ausencia de DHCA (200 µM), no sometidos (A y C) y sometidos a estrés térmico (B y D). En cada caso se realizaron tres experimentos independientes. Los resultados representan la media  $\pm$  SEM. La significación estadística se calculó mediante ANOVA de un factor (\*\* $p < 0,01$  y \*\*\* $p < 0,001$ ).

Los resultados obtenidos en los ensayos realizados en presencia de DHCA 300 µM fueron aún más evidentes, ya que en este caso se encontró una disminución significativa ( $p < 0,001$ ) en los niveles relativos de ROS ya en gusanos jóvenes (descenso superior al 23 %), tanto en condiciones normales de crecimiento como tras aplicación de a estrés térmico, respecto al grupo control (Figura IV.6.5). En los ensayos realizados el día 9 de adulto también se observó

una disminución en los niveles relativos de ROS (21 % respecto al control), significativa ( $p < 0,001$ ) en los nematodos no sometidos a estrés térmico.



**Figura IV.6.5.** Niveles intracelulares relativos de ROS, determinados con DCFH-DA, en *C. elegans* en los días 2 y 9 de adulto, cultivados en presencia o ausencia de DHCA (300 µM), no sometidos (A y C) y sometidos a estrés térmico (B y D). En cada caso se realizaron tres experimentos independientes. Los resultados representan la media  $\pm$  SEM. La significación estadística se calculó mediante ANOVA de un factor (\*\*\*)  $p < 0,001$ ).

La disminución en los niveles de ROS totales en las poblaciones tratadas con DHCA es más evidente en individuos más jóvenes y a la concentración de DHCA más elevada de las ensayadas (300 µM). Aunque la relación entre el grado de reducción en los niveles de ROS con los también observados aumentos

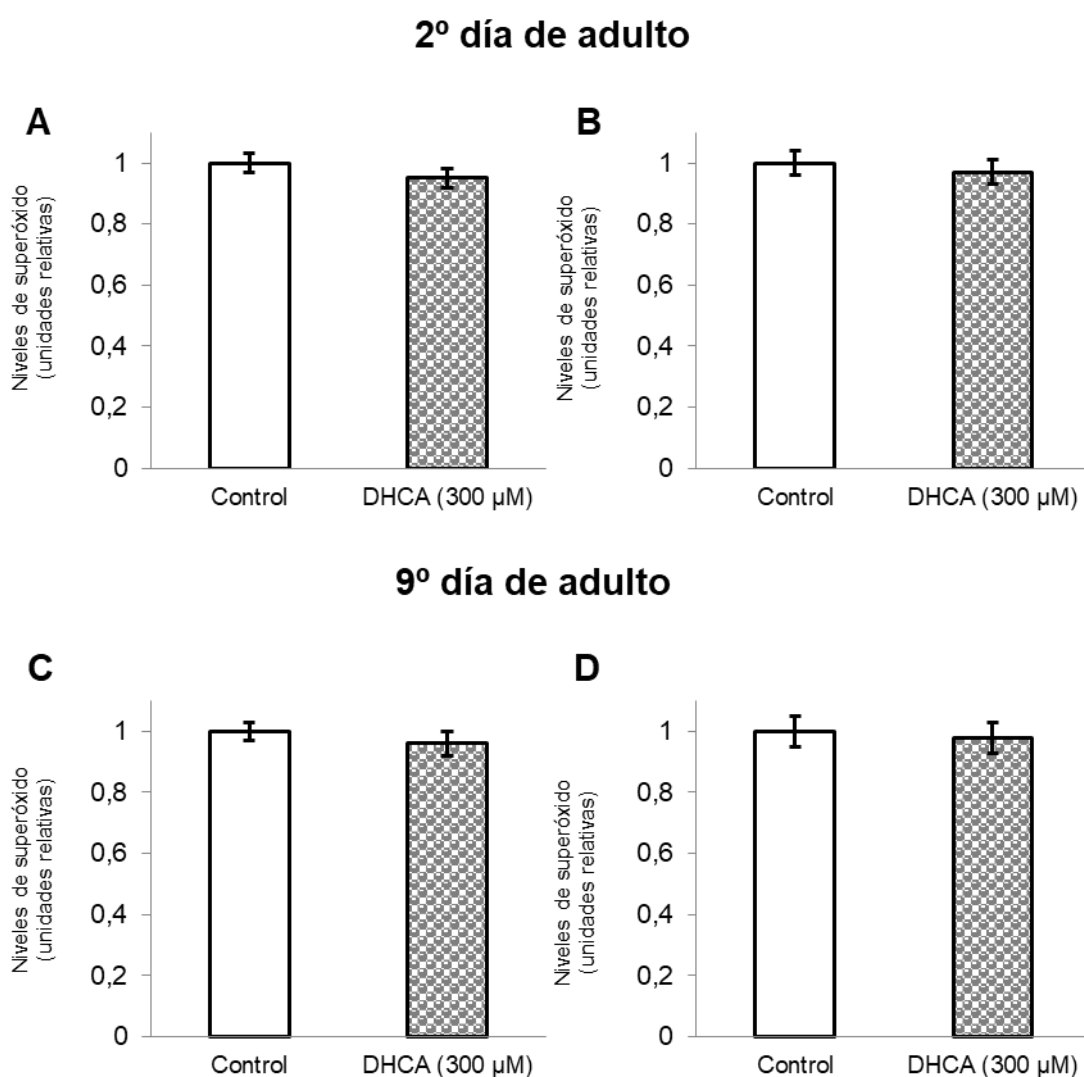
en la resistencia al estrés no es directa, los resultados obtenidos sugieren que el efecto de mejora en la protección frente al daño oxidativo podría estar, al menos en parte, relacionado con la capacidad antioxidante/antirradicalaria de este compuesto. Esta observación no coincide totalmente con la realizada en el caso del ácido cafeico, para el cual la mejora en la resistencia al estrés no siempre se alineaba con una menor concentración de ROS.

Como se ha señalado, no existen, en nuestro conocimiento, estudios anteriores al respecto sobre los efectos del DHCA en *C. elegans*, por lo que los resultados obtenidos no pueden compararse con datos recogidos de la bibliografía. No obstante, la capacidad antioxidante del DHCA ha sido puesta de manifiesto en diferentes estudios *in vitro*. Huang et al. (2004), en ensayos con una línea celular endotelial humana, encontraron que el DHCA tiene capacidad directa para captar ROS y también para aumentar la actividad de la eNOS de manera dosis-dependiente. En células HepG2 también se ha descrito para el DHCA un efecto hepatoprotector al disminuir los niveles de ROS y ser capaz recuperar el GSH agotado (Baeza et al., 2016; Wang et al., 2019) y aumentar la actividad de enzimas antioxidantes y de eNOS (Wang et al., 2019). En células de adenoma humano LT97, Miene et al. (2011) encontraron que el DHCA era capaz de aumentar la expresión de GST-2 y reducir la expresión de la ciclooxigenasa-2 (COX-2), relacionada con una actividad proinflamatoria y sobreexpresada en cáncer de colon, disminuyendo significativamente el nivel de daño oxidativo del ADN. Poquet et al. (2008), también demostraron la capacidad del DHCA para disminuir la citotoxicidad y la producción de citocinas proinflamatorias (IL-6 e IL-8) en células Ha-CaT, un modelo de queratinocitos, sometidas a radiación UV. De acuerdo con los autores, esos efectos podían atribuirse tanto a la captación directa de ROS, a la mejora en las defensas antioxidantes endógenas y/o a una interferencia con la vía implicada en la estimulación de citocinas de daño oxidativo del ADN inducido en estas células.

#### b) Determinación de niveles de superóxido con el reactivo MitoSOX

Se determinaron también los niveles de superóxido en los gusanos cultivados en presencia de 300  $\mu$ M de DHCA. Como se muestra en la Figura IV.6.6, el tratamiento con este ácido fenólico provocó una disminución de los

niveles relativos de este radical en los nematodos expuestos, aunque no significativa ( $p < 0,05$ ), sugiriendo una posible capacidad del DHCA para reducir el mismo. Los resultados son coherentes con los obtenidos para las ROS totales, aunque para ellas las diferencias entre los niveles determinados en gusanos tratados y no tratados con DHCA eran mayores y, en general, significativas, indicando que el superóxido constituiría sólo una parte de las ROS captadas por este compuesto fenólico.

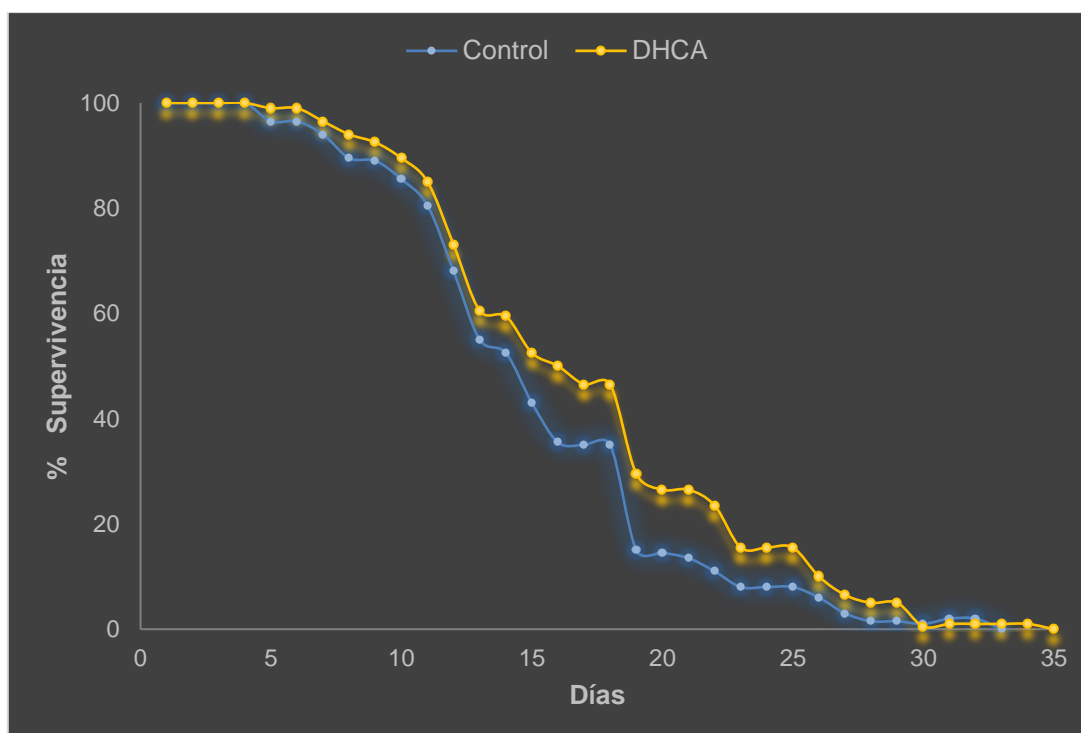


**Figura IV.6.6.** Niveles relativos de superóxido en *C. elegans* en los días 2 y 9 de adulto, cultivados en presencia o ausencia de DHCA (300 µM), no sometidos (A y C) y sometidos a estrés térmico (B y D). En cada caso se realizaron tres experimentos independientes. Los resultados representan la media  $\pm$  SEM. La significación estadística se calculó mediante ANOVA de un factor ( $p < 0,05$ ).



#### 4.6.3 Estudios de longevidad

Gusanos sincronizados en estado larvario L1 eran cultivados en placas suplementadas con DHCA (300  $\mu$ M) hasta alcanzar la fase L4. Posteriormente, se transferían a placas nuevas también con el compuesto fenólico y a partir de este momento se comenzaba el recuento de gusanos supervivientes hasta muerte de toda la población. La Figura IV.6.7 muestra las curvas de supervivencia de los gusanos tratados con DHCA y control (sin tratamiento), y en la Tabla VI.6.1 se recogen los datos de vida media y máxima. Como se puede comprobar, el tratamiento con DHCA provocó un aumento significativo ( $p < 0,001$ ) en la vida media de *C. elegans* ( $18,7 \pm 0,46$  días), en comparación con el grupo control ( $16,4 \pm 0,39$  días). Además, también se encontró un incremento significativo ( $p < 0,01$ ) en la vida máxima (duración de vida del 10 % de la población más longeva) en los gusanos tratados con DHCA ( $28,9 \pm 0,45$  días) respecto al grupo control ( $26,9 \pm 0,63$  días).



**Figura IV.6.7.** Curvas de supervivencia de *C. elegans* cultivados a 20 °C en ausencia (control) y presencia de DHCA (300  $\mu$ M).

**Tabla IV.6.1.** Influencia de DHCA (300  $\mu$ M) sobre la duración media y máxima de vida de *C. elegans* en condiciones normales de crecimiento a 20 °C. Los resultados representan la media  $\pm$  SEM (n = 3).

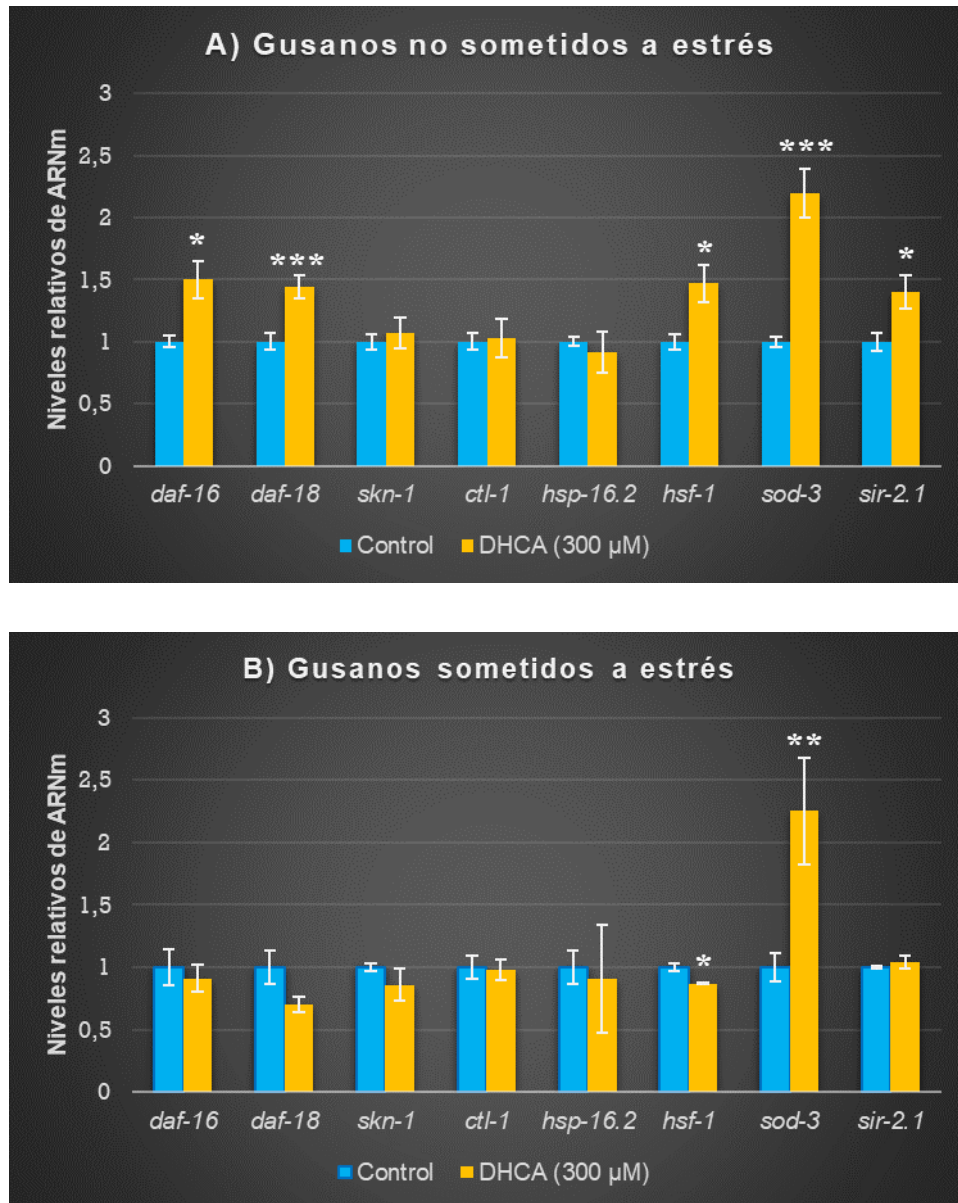
Tratamiento	Vida media (días)	<i>p</i> vs Control (Log-Rank)	Vida máxima 10 % (días)*	<i>p</i> vs Control (ANOVA)
Control	16,4 $\pm$ 0,39		26,9 $\pm$ 0,63	
DHCA (300 $\mu$ M)	18,7 $\pm$ 0,46	0,001	28,9 $\pm$ 0,45	0,014

\* Tiempo promedio de vida del 10% de la población más longeva.

Como se ha indicado anteriormente, no se conocen estudios sobre los efectos del DHCA en *C. elegans*, por lo que estos datos no pueden ser comparados con información previa obtenida de la bibliografía. En todo caso, los resultados encontrados coinciden básicamente con los obtenidos para el CA (ver apartado 4.5.3). Nuevamente, el aumento en la longevidad inducido por el DHCA se acompaña de una mejora en la resistencia de los animales al estrés oxidativo, como ha sido puesto de manifiesto en estudios realizados por otros investigadores con distintos compuestos fenólicos, incluyendo ácido cafeico y derivados (Pietsch et al., 2011; Havermann et al., 2014; Zheng et al., 2017), pudiendo realizarse, en este sentido, las mismas consideraciones que en el apartado 4.5.3.

#### 4.6.4 Estudio de los mecanismos moleculares implicados en los efectos del ácido dihidrocafeico

Al igual que para el CA, se realizaron estudios de expresión génica con el objeto de profundizar en los mecanismos moleculares implicados en los efectos del DHCA. En particular, se analizó la expresión de diversos genes de la ruta de señalización de insulina/IGF-1 (*daf-16*, *daf-18*, *skn-1*, *ctl-1*, *hsp-16.2*, *hsf-1* y *sod-3*) y un gen de sirtuinas (*sir-2.1*) mediante RT-qPCR en gusanos tratados previamente con DHCA (300  $\mu$ M) en condiciones normales de crecimiento y tras ser sometidos a estrés térmico (5 h, 35 °C). Los resultados obtenidos se resumen en la Figura IV.6.8.



**Figura IV.6.8.** Efecto de DHCA sobre la expresión de los genes *daf-16*, *daf-18*, *skn-1*, *ctl-1*, *hsp-16.2*, *hsf-1*, *sod-3* y *sir-2.1* en *C. elegans* cultivados en ausencia (controles) y presencia de DHCA (300 µM), en gusanos no sometidos (A) y tras ser sometidos a estrés térmico (35 °C, 5 h) (B). El nivel de expresión fue determinado por RT-qPCR, empleando *act-1* como control interno. Se realizaron nueve experimentos independientes con los nematodos sin estrés (A) y tres experimentos independientes en los nematodos sometidos a estrés (B). Los resultados representan la media ± SEM. La significación estadística se calculó mediante ANOVA de un factor (\*  $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$  y \*\*\* $p < 0,001$ ).

Las observaciones realizadas son similares a las encontradas para el CA, de manera que el tratamiento con DHCA induce una sobreexpresión de los genes *daf-16*, *sod-3*, *daf-18*, *hsf-1* y *sir-2.1* en los gusanos no sometidos a estrés, en tanto que en los sometidos a estrés sólo se mantiene la sobreexpresión de *sod-3* mientras que la expresión de *hsf-1* disminuye. De manera resumida, se pone nuevamente de manifiesto que los efectos del DHCA en *C. elegans* parecen implicar la activación del factor de transcripción DAF-16, clave como se dijo en la ruta IIS, y del gen *sod-3*, que codifica una superóxido dismutasa, que podría contribuir al control de los niveles de especies reactivas de oxígeno, que, como se ha visto en el apartado 4.6.2, están siempre disminuidas en los gusanos tratados con DHCA. Al igual que para el CA, queda en cuestión el papel de los genes de resistencia a estrés térmico, en particular, de *hsf-1*, para el cual resulta difícil explicar la disminución significativa en su expresión encontrada en presencia de DHCA y estrés. La discusión que en este sentido puede realizarse es la misma que ya se ha efectuado para el ácido cafeico y no parece oportuno insistir en los mismos aspectos, por lo que nos remitimos a los comentarios recogidos en el apartado 4.5.4. Por otro lado, la disminución en la expresión del gen *daf-18* en los nematodos sometidos a estrés térmico podría estar relacionada con la modulación ejercida por el DHCA de otros factores relacionados con este gen, como son DAF-2 o AGE-1, que regulan positivamente la ruta de la insulina (Murphy y Hu, 2013; Liu et al., 2014). Sería necesario profundizar en este sentido para explicar la disminución de DAF-18 en los gusanos sometidos a estrés térmico agudo y tratados con DHCA. Hay que indicar que no existen, en nuestro conocimiento, estudios previos con relación a la influencia del DHCA sobre expresión de los genes estudiados en el presente trabajo, por lo que no se pueden comparar los resultados encontrados con datos obtenidos por otros autores.

#### **4.6.3 Conclusiones parciales**

El tratamiento con DHCA (200  $\mu$ M y 300  $\mu$ M) induce un aumento en la supervivencia de *C. elegans* sometido a estrés térmico, más significativo a la concentración 300  $\mu$ M de DHCA en el medio de cultivo. La exposición a DHCA (300  $\mu$ M) también conduce a un aumento significativo en la vida media ( $18,7 \pm$

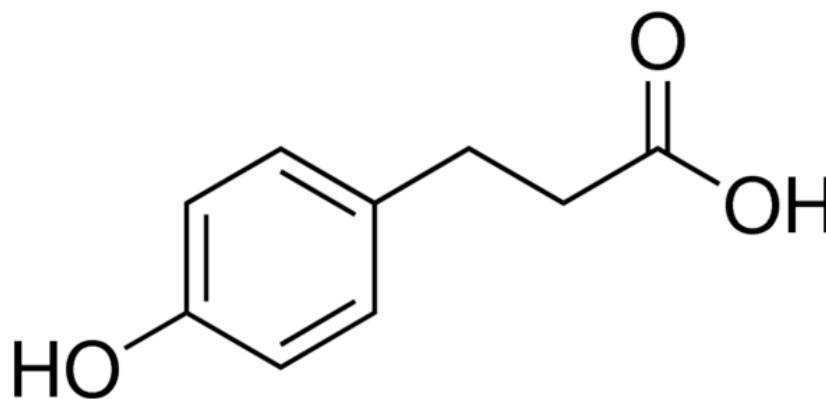
0,46 días) y máxima ( $28,9 \pm 0,45$  días) de *C. elegans*, en comparación con el grupo control no tratado ( $16,4 \pm 0,39$  días y  $26,9 \pm 0,63$  días, respectivamente). Además, el tratamiento con DHCA lleva a una reducción en las concentraciones de ROS, lo que podría estar relacionado con la mejora en la resistencia al estrés producida por este compuesto.

Los ensayos de expresión génica realizados por RT-qPCR pusieron de manifiesto que los efectos favorables del DHCA sobre estrés oxidativo y longevidad, al igual que para el CA, podrían implicar la activación de varios genes relacionados con ruta de la insulina/IGF-1, como *daf-16*, *daf-18*, *hsf-1* y *sod-3*, así como un gen de sirtuinas (*sir-2.1*). Particularmente acentuado es el aumento inducido por el DHCA en la expresión del gen *sod-3*, que podría estar relacionado con el descenso de los niveles de ROS observado en *C. elegans* tratado con DHCA. Sin embargo, la disminución en la expresión de *hsf-1* (significativa) y *daf-18* (no significativa) en los gusanos sometidos a estrés térmico y tratados con DHCA, no deja claro el papel de estos factores de transcripción en condiciones de estrés térmico. Sería necesario, por lo tanto, realizar estudios adicionales para establecer la implicación de los mismos en los efectos ejercidos por DHCA.

#### 4.7 Estudios con ácido 3-(4-hidroxifenil)-propiónico

El ácido 3-(4-hidroxifenil)-propiónico (3-4HPA) (Figura IV.7.1) es un metabolito fenólico producto de la degradación de distintos compuestos fenólicos, como las flavanonas, flavonas, flavan-3-oles, entre otros, por acción de la microbiota colónica (Aura, 2008; Marín et al., 2015). Este compuesto ha sido descrito como el metabolito fenólico más abundante en plasma tras el consumo agudo de zumo de arándanos, rico en antocianos, flavonoles, flavan-3-oles y ácidos fenólicos (Feliciano et al., 2017). Además, el 3-4HPA también ha sido identificado como el principal producto urinario después de una ingesta aguda de teaflavinas (Pereira-Caro et al., 2017). Sin embargo, existe muy poca información acerca de la actividad biológica de este metabolito, para el que se ha descrito actividad antioxidante y antiinflamatoria *in vitro* (Zhang, Y.Y. et al., 2018).

En el presente trabajo se llevan a cabo estudios para evaluar la influencia del 3-4HPA en la resistencia frente a estrés oxidativo inducido térmicamente y en los niveles de ROS intracelular en *C. elegans*.



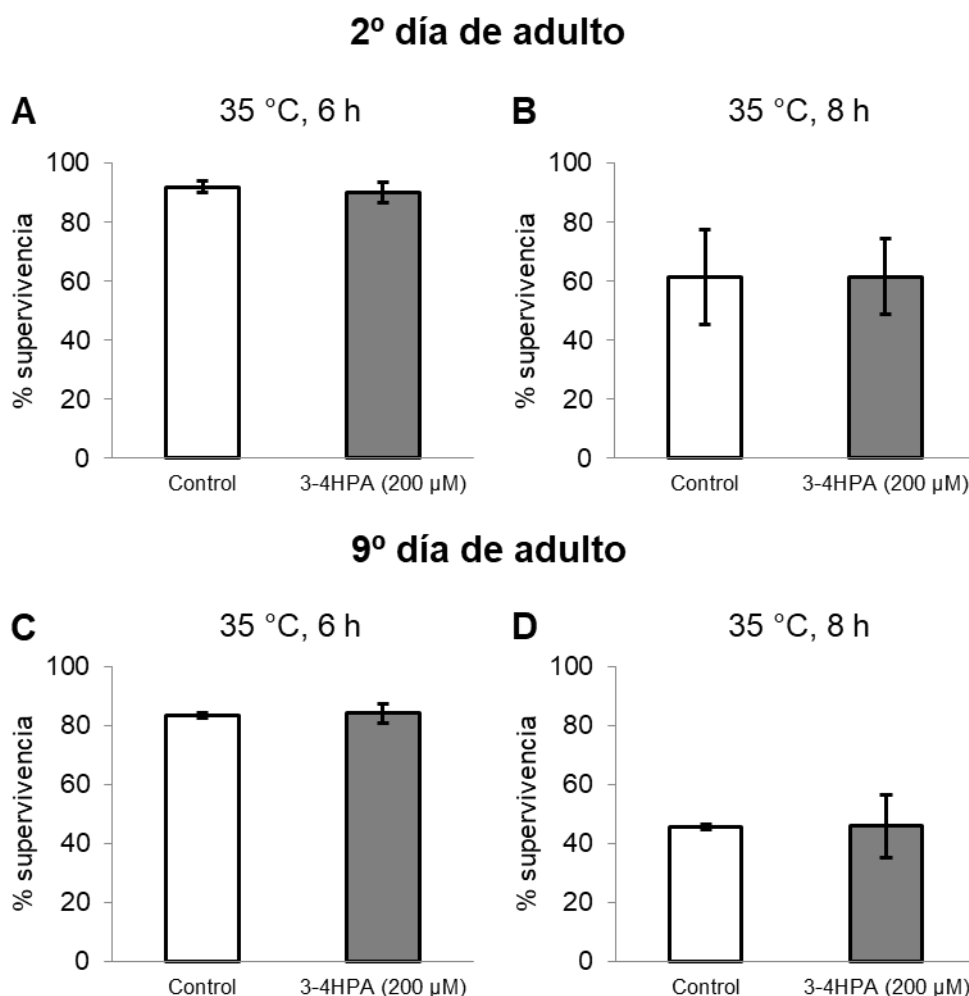
**Figura IV.7.1.** Estructura del ácido 3-(4-hidroxifenil)-propiónico.

#### 4.7.1 Ensayos de estrés térmico

Como con el resto de los metabolitos, el objetivo de este ensayo fue verificar si los gusanos previamente tratados con 3-4HPA (200  $\mu$ M) mejoraban su resistencia frente al estrés oxidativo inducido térmicamente. La aplicación del estrés se realizó en dos estados de desarrollo del nematodo: segundo y noveno día de adulto. Los nematodos eran cultivados en medio NGM que contenía 3-4HPA desde que entraban en la fase larvaria L1, hasta el día del ensayo, en que eran sometidos a una temperatura de 35 °C durante 6 y 8 h, para después comparar su tasa de supervivencia con la de una población control de nematodos sometida a las mismas condiciones de estrés, pero cultivada en ausencia del compuesto.

La Figura IV.7.2 muestra los porcentajes de supervivencia de los nematodos tras ser sometidos a estrés térmico durante 6 y 8 horas a 35 °C. Se puede observar que en ninguno de los casos se encontraron diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) entre los grupos control y los individuos tratados con 3-4HPA (200  $\mu$ M), lo que indica que este metabolito no ejerce influencia sobre la resistencia al estrés en *C. elegans* a la concentración ensayada.

Estos resultados difieren de los obtenidos en los estudios con DHCA (ácido 3-(3,4-dihidroxifenil)-propiónico), compuesto con estructura similar, para el cual sí se encontraba una mejora en la resistencia al estrés térmico (35 °C, 8 h) en los gusanos tratados con la misma concentración (200  $\mu$ M; Figura IV.6.2). La diferencia podría ser quizás explicada por la presencia del grupo catecol en el DHCA, que le conferiría mayor capacidad antioxidante (Bors et al., 1990). Esta suposición se ve, en parte, reforzada por la menor influencia que el tratamiento con 3-4HPA tiene sobre los niveles de ROS (ver apartado 4.7.2) comparado con el encontrado para DHCA (ver apartado 4.6.2).



**Figura IV.7.2.** Porcentajes de supervivencia de *C. elegans* sometidos a estrés térmico (35 °C) durante 6 h (A y C) u 8 h (B y D) en el segundo y noveno día de adulto, cultivados en ausencia (controles) o presencia de 3-4HPA (200 μM). En cada caso se realizaron tres experimentos independientes (300 gusanos por grupo). Los resultados representan la media  $\pm$  SEM. La significación estadística se calculó usando la prueba Chi Cuadrado ( $p < 0,05$ ).

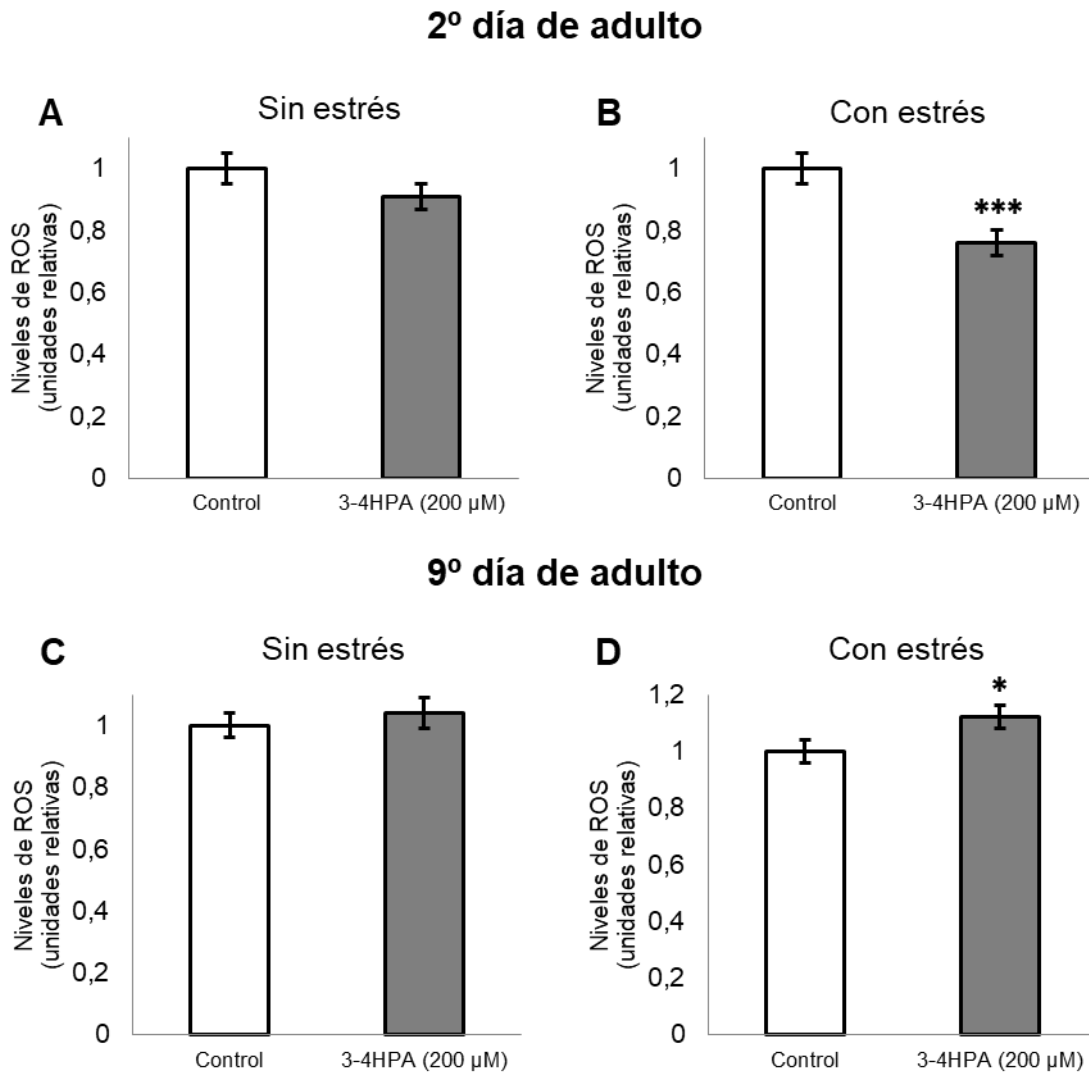
#### 4.7.2 Determinación de niveles intracelulares de ROS

Se determinó el efecto ejercido por el tratamiento con 3-4HPA (200 μM) sobre los niveles de ROS totales en gusanos sometidos o no a estrés térmico (35 °C, 2 h), en el segundo y noveno día de adultos.

Como se puede observar en la Figura IV.7.3, los ensayos realizados el día 2 de adulto mostraron una disminución en los niveles relativos de ROS para el grupo tratado con 3-4HPA con respecto a los animales no tratados. La diferencia fue significativa ( $p < 0,001$ ) para el grupo de tratamiento sometido a



estrés térmico con un 24 % disminución de los niveles de ROS, respecto al grupo control (Figura IV.7.3, B). En los ensayos realizados el noveno día de adulto de los nematodos, por el contrario, se encontró un aumento significativo ( $p < 0,05$ ) del 12 % en los niveles de ROS para el grupo tratado con 3-4HPA tras aplicación del estrés (Figura IV.7.3, D).



**Figura IV.7.3.** Niveles intracelulares relativos de ROS, determinados con DCFH-DA, en *C. elegans* en los días 2 y 9 de adulto, cultivados en presencia o ausencia de 3-4HPA (200 µM), no sometidos (A y C) y sometidos a estrés térmico (B y D). En cada caso se realizaron tres experimentos independientes. Los resultados representan la media  $\pm$  SEM. La significación estadística se calculó mediante ANOVA de un factor (\* $p < 0,05$  y \*\*\* $p < 0,001$ ).

Estos resultados parecen indicar que el 3-4HPA tiene capacidad para inducir un descenso en los niveles de ROS en una etapa joven de *C. elegans*, mientras que la exposición prolongada al mismo tendría efectos prooxidantes o, cuando menos, no protegería contra el aumento de ROS inducido por aplicación de un estrés. Como se ha comentado en apartados anteriores, un nivel ligero de estrés, como el que puede inducir la exposición a algunos compuestos fenólicos, puede ser beneficioso al provocar una activación en los mecanismos de defensa endógenos, haciendo que la célula esté más preparada para soportar un estrés de mayor intensidad (Halliwell, 2008; Tang y Halliwell, 2010). Esta podría ser una explicación para el efecto reductor de ROS encontrado a corto plazo, sin embargo, el tratamiento prolongado con 3-4HPA estaría ya provocando un nivel de estrés superior al que podrían regular eficazmente las defensas antioxidantes endógenas, lo que disminuiría la capacidad de las células para eliminar el exceso de ROS y quizás explicaría el aumento de ROS encontrado en los gusanos envejecidos al ser sometidos a estrés térmico.

Como se comentó anteriormente, existe muy poca información acerca de la actividad biológica de 3-4HPA y, según nuestro conocimiento, no existen trabajos previos con este metabolito *in vivo*. Sin embargo, en un estudio *in vitro* Zhang, Y.Y. et al. (2018) describieron actividad antioxidante y antiinflamatoria para el 3,4-HPA, encontrando que el tratamiento con 3,4-HPA producía una disminución en los niveles de ROS y de citocinas proinflamatorias (IL-6 y IL-1 $\beta$ ) en las células espumosas con inflamación inducida por (LDL-ox).

Al igual que se discutió para otros ácidos fenólicos ensayados en este trabajo, no siempre puede establecerse una relación directa entre los niveles de ROS determinados y la resistencia al estrés térmico en las condiciones estudiadas, como también se pone de manifiesto en los resultados ahora obtenidos, donde las variaciones en las ROS no se acompañan de mejora en la termotolerancia con relación a las poblaciones control del gusano.

#### 4.5.2 Conclusiones parciales

El tratamiento con 3-4HPA (200  $\mu$ M) no tiene influencia sobre la resistencia al estrés oxidativo inducido térmicamente en *C. elegans*, lo que difiere de lo observado en el caso del DHCA (ácido 3-(3,4-dihidroxifenil)-propiónico),

compuesto de estructura similar, para el que se había encontrado la inducción de cierta mejora en la resistencia al estrés. La presencia de un grupo catecol en el DHCA del que carece el 3-4HPA podría estar en el origen del diferente comportamiento, ya que el mismo conferiría mayor capacidad antioxidante.

El 3-4HPA muestra capacidad para inducir un descenso en los niveles de ROS en gusanos jóvenes, pero no en individuos envejecidos. Una posible explicación podría ser que el tratamiento prolongado con 3-4HPA conduzca a un nivel de estrés superior al que podrían regular eficazmente las defensas antioxidantes endógenas, disminuyendo la capacidad de las células para eliminar la producción de ROS inducida por la aplicación del estrés. En definitiva, a largo plazo, el 3-4HPA estaría mostrando una actividad pro-oxidante. Al igual que para otros ácidos fenólicos, la resistencia a estrés térmico no parece guardar relación directa con los niveles de ROS totales.

## 4.8 Preparación y caracterización de sulfatos del ácido protocatéquico

Los compuestos fenólicos son, en general, escasamente absorbidos y extensamente biotransformados en el cuerpo humano, ya sea por enzimas de las fases I y II del metabolismo o por la microbiota intestinal. La mayoría de los compuestos fenólicos consumidos alcanza el intestino grueso, donde interactúan con la flora colónica y son degradados a una gama de metabolitos que pueden ser bioactivos y contribuir a los efectos para la salud asociados a los compuestos originales (Crozier et al., 2009; Valdés et al., 2015; Tomás-Barberán et al., 2016; Williamson y Clifford, 2017). De hecho, las concentraciones en plasma y orina de los metabolitos fenólicos microbianos son normalmente más altas que las de los metabolitos de fase II derivados de la absorción de compuestos fenólicos en el intestino delgado (Rechner et al., 2002; Serra et al., 2012; Czank et al., 2013; De Ferrars et al., 2014a,b). En general, los sulfatos fenólicos se han indicado como metabolitos abundantes de los compuestos fenólicos en plasma humano (Pimpão et al., 2015).

El ácido protocatéquico se produce en el organismo humano como un metabolito de la degradación de los compuestos fenólicos por la microbiota intestinal, particularmente de flavonoides como antocianos, flavonoles o procianidinas (Masella et al., 2012). El PCA puede ser absorbido a través del epitelio intestinal y alcanzar la circulación sistémica. Una vez absorbido, sufre una serie de modificaciones estructurales a través de procesos de conjugación, que ocurren principalmente en el hígado, dando lugar a formas sulfatadas y glucuronidadas que pueden distribuirse a los tejidos, reciclarse al intestino o ser excretadas por orina (Crozier et al., 2010; Del Rio et al., 2013). Se han encontrado concentraciones relevantes de conjugados de PCA en plasma, orina y heces después del consumo de dietas ricas en compuestos fenólicos (Czank et al., 2103; De Ferrars et al., 2014a,b; Pimpão et al., 2014, 2015). Czank et al. (2013) determinaron concentraciones de conjugados de fase II (sulfatos, glucurónidos y metilados) de PCA en orina humana de  $5540 \pm 490$  nM después del consumo de 500 mg de cianidina-3-O-glucósido marcado con  $^{13}\text{C}$ , alcanzando el nivel máximo 24 h después de la ingesta. De Ferrars et al. (2014a)

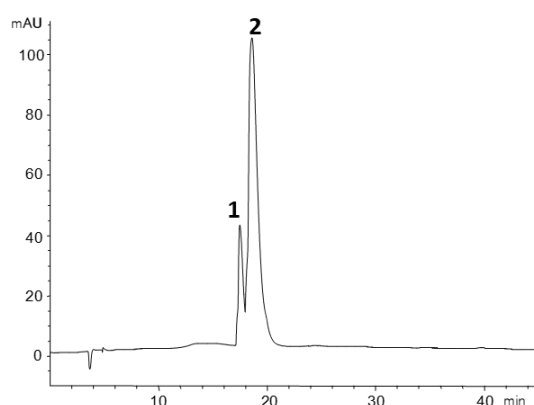
encontraron que los sulfatos de PCA constituían el grupo principal de metabolitos fenólicos en plasma, representando el 28,31% del total de metabolitos detectados 3 h después de una ingesta aguda de 500 mg de extracto de saúco por mujeres postmenopáusicas. De Ferrars et al. (2014b) determinaron concentraciones máximas de sulfatos de PCA de  $157 \pm 116$  nM en suero, y de  $1112 \pm 318$  nM y  $1244 \pm 333$  nM para PCA-3-sulfato y PCA-4-sulfato, respectivamente, en orina, tras ingesta de 500 mg antocianos.

Un problema común para estudiar los efectos y la actividad de los metabolitos conjugados de compuestos fenólicos, como los sulfatos de PCA, es la falta habitual de patrones comerciales, por lo que deben prepararse en el laboratorio. Zhang et al. (2012) y Almeida et al. (2017) describieron procedimientos para la síntesis química de sulfatos de diferentes hidroxibenzoatos, incluido el ácido protocatéquico. El método de Zhang et al. (2012) implicaba la protección selectiva de grupos hidroxilo en forma de ésteres bencílicos o éteres de *tert*-butildimetilsililo y una posterior sulfatación con clorosulfato de tricloroetilo (TCE); finalmente, los grupos protectores (TCE, bencilo, sililo) se eliminaban por hidrogenación en condiciones reductoras suaves. El procedimiento propuesto por Almeida et al. (2017) consistía en la reacción de los ácidos fenólicos con el complejo trióxido de azufre piridina y posterior purificación en una resina de intercambio iónico Dowex 50W-X8.

En el presente estudio, se propone otro método sencillo y fácilmente reproducible utilizando trióxido de azufre-N-trietilamina como reactivo de sulfatación para la preparación de sulfatos de PCA. Los compuestos obtenidos se caracterizan estructuralmente por RMN y se aportan datos sobre sus características espectrales UV y de masas, así como información sobre su estabilidad. Se espera que este conocimiento contribuya a la correcta identificación de estos metabolitos en muestras biológicas, y que el procedimiento propuesto pueda ser utilizado para la preparación de sulfatos de PCA en vista de su empleo en estudios sobre su actividad biológica y mecanismos de acción.

#### 4.8.1 Preparación de sulfatos de PCA

Los sulfatos de PCA se prepararon por reacción del ácido fenólico con trióxido de azufre-N-trietilamina, reactivo que había sido utilizado previamente en el laboratorio para la síntesis de sulfatos de flavonoides (González-Manzano et al., 2009). El procedimiento ahora optimizado se describe detalladamente en el apartado 3.2.10 de la sección de materiales y métodos. De manera breve, se utiliza un tiempo de reacción de 3 h, al cual se alcanza la máxima formación de sulfatos, según se comprobó por seguimiento mediante HPLC. Como resultado se obtiene un conjunto de mono- y disulfatos de PCA, junto con PCA sobrante, que posteriormente se separan por HPLC a escala semipreparativa, para obtener una fracción que contiene una mezcla de PCA-3-sulfato y PCA-4-sulfato. Los dos monosulfatos eluyen a tiempos de retención muy cercanos, esto hace muy difícil su separación cromatográfica, como también ha sido comprobado por otros autores (De Ferrars et al., 2014; Pimpão et al., 2014 y 2015; Almeida et al., 2017), por lo que la obtención de los compuestos individuales puros es complicada. La fracción obtenida se pasa seguidamente a través de un cartucho de intercambio iónico Oasis MCX para eliminar la trimetilamina residual, y finalmente los sulfatos se convierten en sus sales sódicas para mejorar su estabilidad y se liofilizan. Por este procedimiento se pudieron obtener 128 mg de una fracción limpia que contenía la mezcla de los monosulfatos de PCA partiendo de 500 mg de PCA, lo que representó un rendimiento del 15,5%. La Figura IV.8.1 muestra el cromatograma de la fracción obtenida.

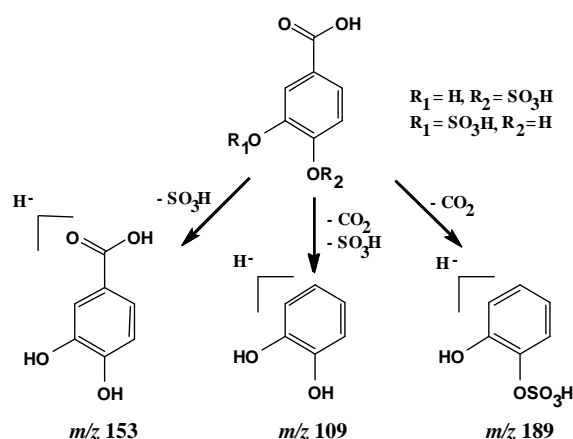


**Figura IV.8.1.** Cromatograma de HPLC registrado a 250 nm correspondiente a la mezcla de monosulfatos de PCA obtenida. Identificación de los picos: (1) PCA-4-sulfato, y (2) PCA-3-sulfato.

Comparado con los métodos descritos anteriormente para la síntesis de sulfatos de ácidos benzoicos (Zhang et al., 2012; Almeida et al., 2017), el procedimiento propuesto es más rápido y simple y sólo implica una etapa de reacción. Se emplea un reactivo de sulfatación diferente (trióxido de azufre-N-trietilamina) y se evita el uso de piridina, lo que lo hace más seguro y facilita la eliminación del disolvente y del exceso de reactivo. En los ensayos preliminares que se realizaron para la optimización de método se verificó, de hecho, que cuando se empleaba piridina se producían pérdidas de los productos durante la eliminación del disolvente, como también pusieron de manifiesto Almeida et al. (2017).

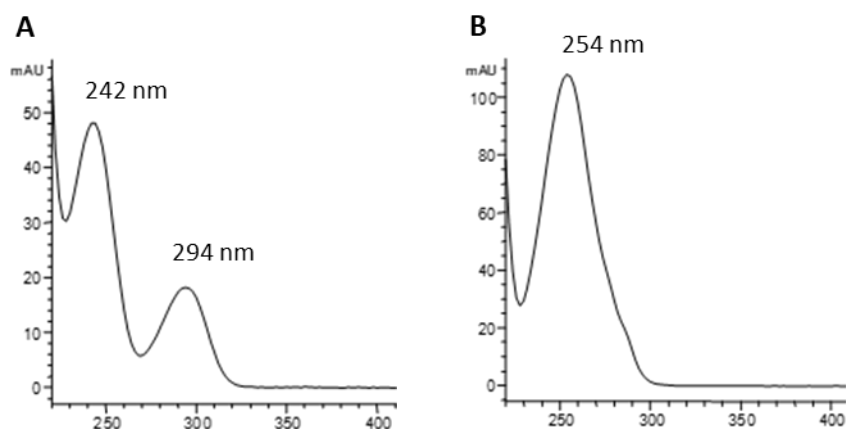
#### **4.8.2 Características espectrales de absorción y de masas de los sulfatos de PCA**

El análisis por ESI/MS de los picos 1 y 2 del cromatograma de la Figura IV.8.1 confirmó que poseían el mismo ion pseudomolecular  $[M-H]^-$  de  $m/z$  233, correspondiente a monosulfatos de PCA, y que también mostraban el mismo patrón de fragmentación  $MS^2$  dando lugar a fragmentos de  $m/z$  189, 153 y 109. El ión de  $m/z$  189 puede atribuirse a la pérdida de  $CO_2$  ( $[M-H-44]^-$ ) del grupo carboxilo del PCA, lo que indica que este grupo funcional no está sustituido y confirma que el resto sulfato se encuentra localizado sobre uno de los hidroxilos fenólicos. El fragmento de  $m/z$  109 se atribuye a la pérdida adicional del grupo sulfato ( $[M-H-44-80]^-$ ), mientras que el fragmento de  $m/z$  153 corresponde al ácido protocatéquico por pérdida del grupo de sulfato ( $[MH-80]^-$ ) (Figura IV.8.2).



**Figura IV.8.2.** Fragmentación  $MS^2$  de los picos 1 y 2 del cromatograma de la Figura IV.8.1, correspondientes a los monosulfatos de PCA (ión pseudomolecular  $[m-H]^-$  de  $m/z$  233).

Para ambos compuestos, el fragmento  $MS^2$  mayoritario (100% de abundancia relativa) era el correspondiente a PCA ( $m/z$  153), con ligeras diferencias en las abundancias relativas de los otros dos fragmentos. Para el pico 1, la abundancia del ion de  $m/z$  109 fue del 74% y del ion de  $m/z$  189 del 5%, mientras que para el pico 2 la abundancia de iones fue del 78% ( $m/z$  109) y del 4% ( $m/z$  189). Curiosamente, los picos poseían diferentes espectros UV. El pico 1 presentaba dos bandas de máxima absorción a 242 nm y 294 nm, mientras que el pico 2 sólo mostraba una a 254 nm (Figura IV.8.3). La existencia de diferente patrón de fragmentación y, sobre todo, en forma del espectro UV son características que podrían permitir la asignación de la identidad de los picos en una muestra con una composición desconocida.

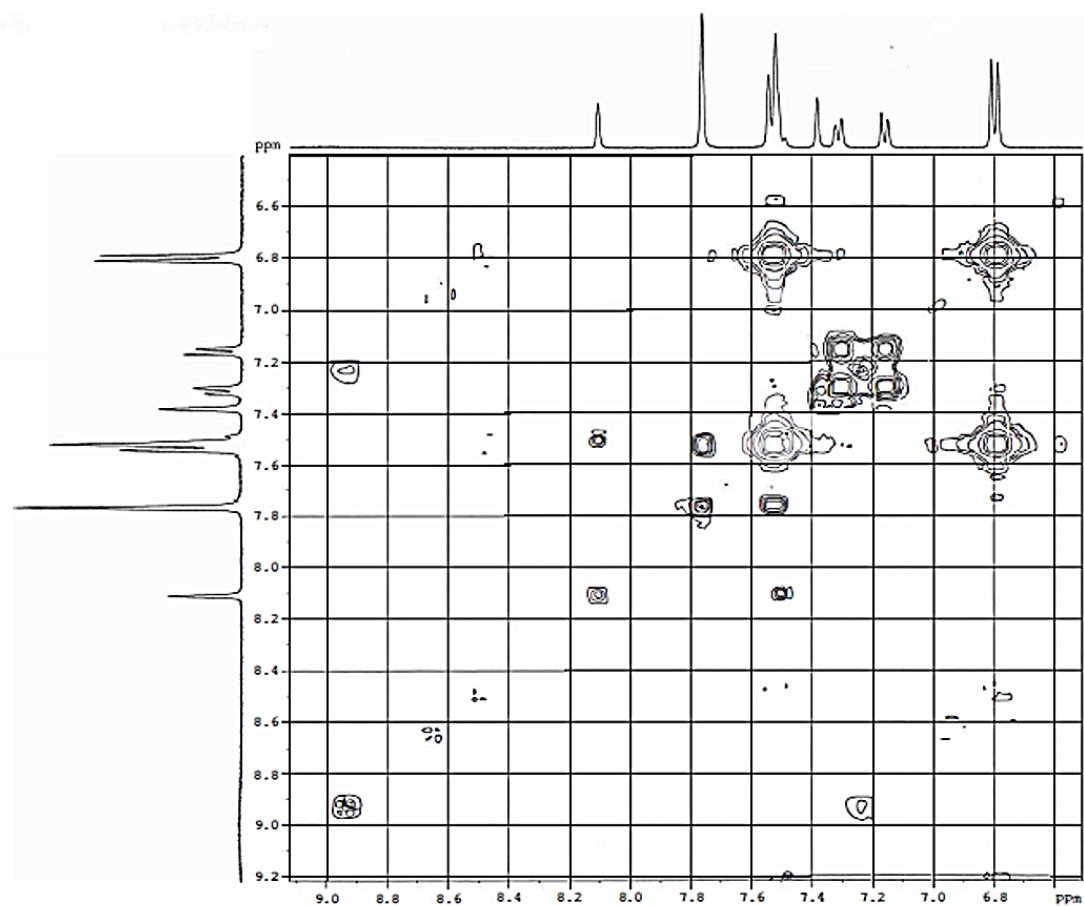


**Figura IV.8.3.** Espectros UV de los picos 1 (A) y 2 (B) del cromatograma de la Figura IV.8.1.

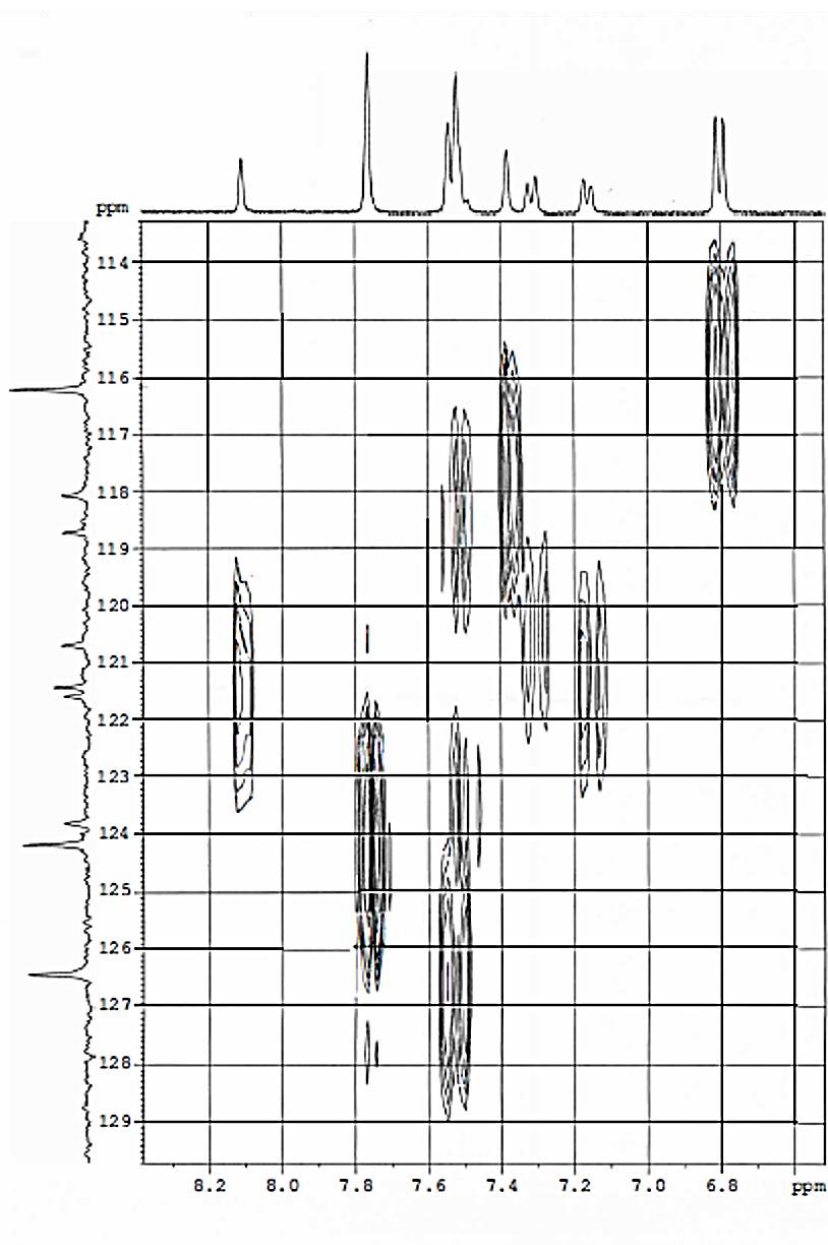


### 4.8.3 Análisis por RMN

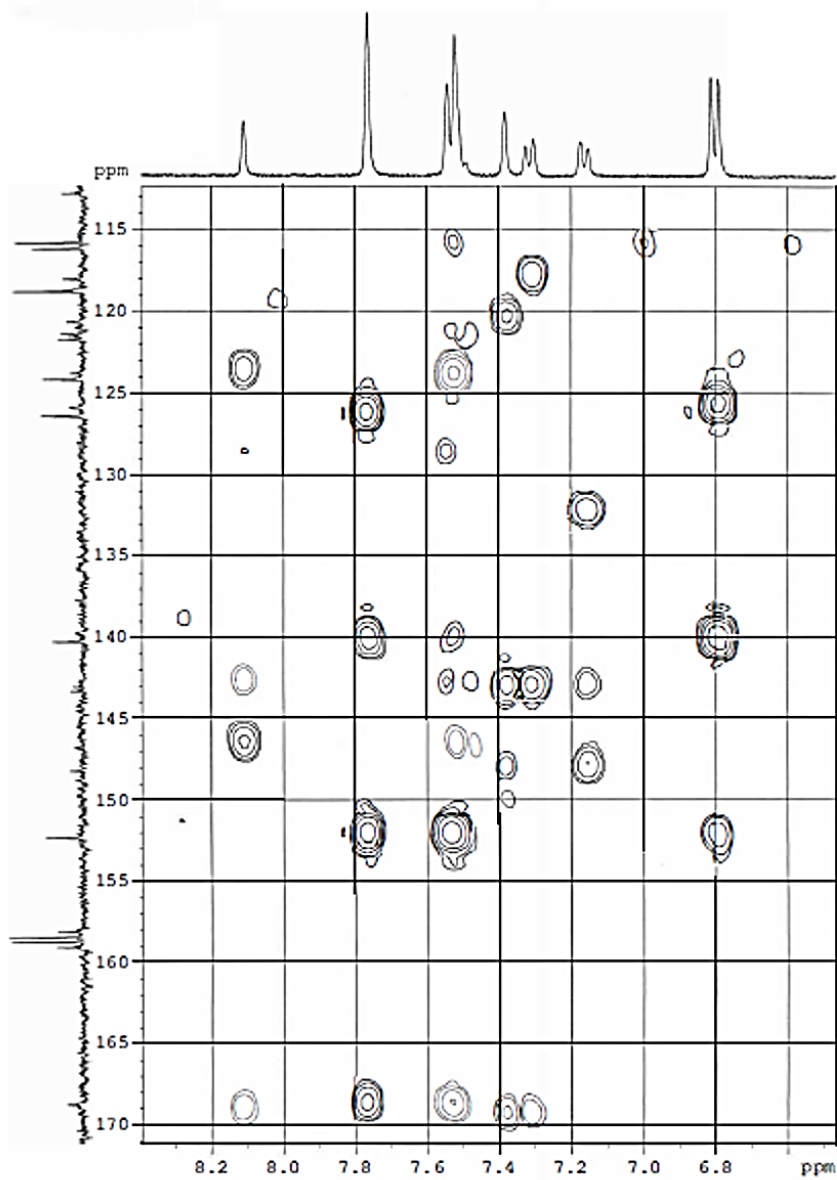
El espectro de RMN de la mezcla de monosulfatos de PCA reveló dos series de picos análogos con dos dobletes y un singlete para cada serie. Las gráficas COSY, HMBC y HSQC (Figuras IV.8.4-6) no mostraron interacciones entre las dos series de picos, confirmando la existencia de dos compuestos diferentes. En la Tabla IV.8.1 se presentan los valores obtenidos en los espectros RMN de  $^1\text{H}$  y de  $^{13}\text{C}$  y las asignaciones de los desplazamientos de los protones y carbonos en cada posición del anillo aromático realizado en base a los espectros bidimensionales  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HMBC y HSQC. Los resultados estuvieron de acuerdo con los datos predichos por el software Perkin Elmer ChemDraw Professional 16.0.1.4 (77), con pequeñas modificaciones en el desplazamiento de los protones en la posición 2 para PCA-3-sulfato y en la posición 5 para PCA-4 sulfato. Estas diferencias se explican por la influencia del grupo de sulfato adyacente, que tiene una rotación libre y puede adoptar una conformación dando lugar a una interacción mayor de la esperada teóricamente. El compuesto mayoritario de la mezcla se asignó a PCA-3-sulfato, para el que se encontró que el protón en posición 2 aparecía a 7,76 ppm y experimentaba un cambio a un campo más bajo del previsto teóricamente (6,85 ppm), mientras que el desplazamiento del protón H5 no se modificaba con respecto al esperado. En el compuesto minoritario (PCA-4-sulfato), el protón H5 experimentaba un desplazamiento de campo más bajo (7,14 ppm) del esperado teóricamente (6,85 ppm), lo que se explicaría por la interacción con el grupo sulfato adyacente. De acuerdo con lo determinado por RMN, la proporción entre los dos sulfatos era de 1:2,5. La identificación de PCA-3-sulfato como el compuesto mayoritario permite asignarlo al pico 2 en el cromatograma de la Figura IV.8.1 y, por tanto, el pico 1, para que se obtenía una señal de RMN más baja, se asignó al PCA-4-sulfato.



**Figura IV.8.4.** Espectro de correlación RMN <sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H COSY en 2D de PCA-3-sulfato y PCA-4 sulfato (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>).



**Figura IV.8.5.** Espectro de correlación RMN  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HSQC en 2D de PCA-3-sulfato y del PCA-4 sulfato (400 MHz/100 MHz, DMSO- $d_6$ ).



**Figura IV.8.6.** Espectro de correlación RMN  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HMBC en 2D de PCA-3-sulfato y del PCA-4 sulfato (400 MHz/100 MHz, DMSO- $d_6$ ).

**Tabla IV.8.1.** Datos de los espectros RMN de  $^1\text{H}$  y de  $^{13}\text{C}$  NMR, y correlaciones HMBC obtenidas para PCA-3-sulfato y PCA-4 sulfato determinados en DMSO deuterado.

Posición	$\delta$ $^1\text{H}$ (ppm); m; J (Hz)	$\delta$ $^{13}\text{C}$ (ppm)	HMBC
<b>PCA-3-sulfato</b>			
1		125,2	H2, H5
2	7,76, s <sup>a</sup>	124,1	H6
3		140	H2, H5, H6
4		152,3	H2, H5, H6
5	6,80, d, J=8,0	116,2	H6
6	7,50, d, J=8,4	126,5	H2, H5
<b>Carbonilo</b>		169	H2, H6
<b>PCA-4-sulfato</b>			
1		148,1	H2, H5
2	7,40, s	118,1	H6
3		148,1	H5, H2
4		143,2	H2, H6, H5
5	7,14, d, J=9,2	121,4	
6	7,31, d, J=9,8	120,7	H2
<b>Carbonilo</b>		169	H2, H6
<sup>a</sup> s, singlete; d, doblete.			

#### 4.8.4 Estabilidad de los sulfatos liofilizados

El extracto que contenía los dos sulfatos se liofilizó y almacenó en un desecador a temperatura de laboratorio durante 3 meses. En los días 1, 15, 30, 60 y 90, se pesó una cantidad de 2 mg y se disolvió en agua ultrapura, para obtener una concentración final de 0,1 mg/mL, que se analizó por HPLC. De acuerdo con las áreas de los picos registradas a 250 nm (Tabla IV.8.2), se puede considerar que los compuestos liofilizados solo mantenían una estabilidad razonable durante aproximadamente 15 días (88% del área del pico inicial para PCA-4-sulfato y 85% para PCA-3-sulfato) para caer luego rápidamente hasta el 2% de su concentración inicial en el día 30 de almacenamiento. Esta pérdida se atribuyó principalmente a la escisión del resto sulfato para liberar PCA, como se observó en los cromatogramas. La estabilidad de los dos sulfatos era similar.

**Tabla IV.8.2.** Evolución de las áreas (mAU) de los picos cromatográficos de PCA-4-sulfato y PCA-3-sulfato registrados a 250 nm a lo largo de 3 meses de almacenamiento del extracto liofilizado a temperatura de laboratorio.

Tiempo (días)	PCA-4-sulfato (mAU)	PCA-3-sulfato (mAU)
1	1203,6 (100%*)	5940,4 (100%)
15	1062,3 (88%)	5095,5 (85%)
30	23,4 (2%)	163,8 (2,7%)
60	18 (1,5%)	123,6 (2%)
90	0 (0%)	132,3 (2,2%)

\* entre paréntesis se indica el porcentaje de área de cada pico con relación al día 1.

#### 4.8.5 Conclusiones parciales

Se optimizó un procedimiento de hemisíntesis para la preparación de sulfatos del ácido protocatéquico. El método propuesto presenta la ventaja de ser más simple en comparación con otros descritos en la bibliografía, ya que implica una sola etapa de reacción, emplear un reactivo de sulfatación (trióxido de azufre-N-trietilamina) y disolventes más fáciles de eliminar y seguros, y una cinética de la reacción más rápida. Por este método se consiguió obtener PCA-3-sulfato y PCA-4-sulfato, con un rendimiento del 15,5%, que se caracterizaron por HPLC-DAD-ESI/MS y RMN. Estos metabolitos son de interés para su uso posterior en ensayos *in vivo* e *in vitro* para el estudio de la actividad biológica y mecanismos implicados en los efectos de los compuestos fenólicos de la dieta. Los sulfatos de PCA preparados y los datos obtenidos sobre sus características analíticas, especialmente el comportamiento diferencial observado en los espectros UV, son asimismo de gran utilidad como estándares analíticos para la identificación de metabolitos fenólicos en muestras de composición desconocida.

## *V. CONCLUSIONES*





Los ácidos fenólicos estudiados (ácido protocatéquico (PCA), ácido vanílico (VA), ácido 3,4-dihidroxifenilacético (DHPAA), ácido 3-(4-hidroxifenil)-propiónico (3-4HPA), ácido dihidrocafeico (DHCA) y ácido cafeico (CA)) conducen, en general, a efectos favorables sobre la resistencia al estrés oxidativo en *C. elegans*. No obstante, se observan diferencias en función de la concentración y del compuesto ensayados. En este sentido, parece apuntarse que el aumento de concentración por encima de determinados valores puede producir efectos adversos.

En los ensayos realizados con los ácidos PCA, CA, y DHCA la modulación de los niveles de especies reactivas de oxígeno (ROS) podría estar relacionada con la capacidad de estos compuestos para mejorar la resistencia al estrés térmico. Sin embargo, esta premisa no se cumple para el resto de ácidos estudiados, por lo que no se puede establecer de forma general la existencia de una relación, al menos directa, entre niveles de ROS y grado de resistencia a estrés del nematodo.

El tratamiento con CA y DHCA a las concentraciones ensayadas produce un aumento significativo en la vida media y máxima de *C. elegans*, resultado que no se observa en el caso del PCA. Los tres compuestos, sin embargo, mejoran la resistencia a estrés oxidativo, lo que parece indicar que subyacen mecanismos diferentes en los efectos inducidos por los mismos sobre longevidad y estrés oxidativo.

En estudios de expresión génica se puso de manifiesto que los efectos favorables de CA y DHCA sobre estrés oxidativo y longevidad podrían implicar la activación de varios genes relacionados con ruta de la insulina/IGF-1, en particular *daf-16*, *daf-18*, *hsf-1* y *sod-3*, así como un gen de sirtuinas (*sir-2.1*). Sin embargo, en condiciones de estrés térmico solo se continuaba observando sobreexpresión de *sod-3*, mientras que se producía una disminución significativa en la expresión de *hsf-1*. Este resultado inesperado pone en duda el papel de este factor de transcripción en los mecanismos de acción de los compuestos, señalando que tienen que existir otras rutas no contempladas en el presente trabajo para explicar los efectos inducidos por estos ácidos.

Se puso a punto un método para la preparación de sulfatos de PCA, que permitió obtener y caracterizar estructuralmente PCA-3-sulfato y PCA-4-sulfato. El procedimiento desarrollado hace posible disponer de estos metabolitos para realizar estudios *in vitro* e *in vivo* sobre la actividad biológica y mecanismos de los compuestos fenólicos de la dieta. Asimismo, los datos obtenidos sobre sus características analíticas, especialmente el comportamiento diferencial observado en los espectros UV, son también de gran utilidad para el empleo como referencias analíticas en la identificación de estos metabolitos en muestras de composición desconocida.

## *VI. BIBLIOGRAFÍA*



- Abbas, S.; Wink, M. Epigallocatechin gallate from green tea (*Camellia sinensis*) increases lifespan and stress resistance in *Caenorhabditis elegans*. *Planta Med.* (2009), 75, 216–221.
- Abele, D.; Heise, K.; Portner, H.O.; Puntarulo, S. Temperature-dependence of mitochondrial function and production of reactive oxygen species in the intertidal mud clam *Mya arenaria*. *J. Exp. Biol.* (2002), 205, 1831-1841.
- Accili, D.; Arden, K.C. FoxOs at the crossroads of cellular metabolism, differentiation, and transformation. *Cell.* (2004), 117, 421-426.
- Adlercreutz, H. Lignans and human health. *Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences.* (2007), 44, 483-525.
- Ahn, C.B.; Je, J.Y.; Kim, Y.S.; Park, S.J.; Kim, B.I. Induction of Nrf2-mediated phase II detoxifying/antioxidant enzymes *in vitro* by chitosan-caffeic acid against hydrogen peroxide-induced hepatotoxicity through JNK/ERK pathway. *Mol. Cell. Biochem.* (2017), 424, 79-86.
- Almeida, A.F.; Santos, C.N.; Ventura, M.R. Synthesis of new sulfated and glucuronated metabolites of dietary phenolic compounds identified in human biological samples. *Journal of Agricultural and Food Chemistry.* (2017), 65, 6460-6466.
- Almeida, I.; Cavalcante, F.; Vicentini, V. Different responses of vanillic acid, a phenolic compound, in htc cells: Cytotoxicity, antiproliferative activity, and protection from DNA-induced damage. *Genet. Mol. Res.* (2016), 15, 1-12.
- Altintas, O.; Park, S.; Lee, S.J.V. The role of insulin/IGF-1 signaling in the longevity of model in vertebrates, *C. elegans* and *D. melanogaster*. *BMB Reports.* (2016), 49, 81-92.
- Amin, F.U.; Shah, S.A.; Kim, M.O. Vanillic acid attenuates A $\beta$ <sub>1-42</sub>-induced oxidative stress and cognitive impairment in mice. *Sci. Rep.* (2017), 7, 40753.
- Amin, H.P.; Czank, C.; Raheem, S.; Zhang, Q.; Botting, N.P.; Cassidy, A.; Kay, C.D. Anthocyanins and their physiologically relevant metabolites alter the expression of IL-6 and VCAM-1 in CD40L and oxidized LDL challenged vascular endothelial cells. *Mol. Nutr. Food Res.* (2015), 59, 1095–1106.
- An, J.H.; Blackwell, T.K. SKN-1 links *C. elegans* mesendodermal specification to a conserved oxidative stress response. *Genes & Development.* (2003), 17, 1882-93.

- An, J.H.; Vranas, K.; Lucke, M.; Inoue, H.; Hisamoto, N.; Matsumoto, K.; Blackwell, T.K. Regulation of the *Caenorhabditis elegans* oxidative stress defense protein SKN-1 by glycogen synthase kinase-3. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. (2005), 102, 16275-16280.
- An, L.J.; Guan, S.; Shi, G.F.; Bao, Y.M.; Duan, Y.L.; Jiang, B. Protocatechuic acid from *Alpinia oxyphylla* against MPP+-induced neurotoxicity in PC12 cells. *Food Chem. Toxicol.* (2006), 44, 436-443.
- Anckar, J.; Sistonen, L. Regulation of HSF1 function in the heat stress response: implications in aging and disease. *Annu. Rev. Biochem.* (2011), 80, 1089–1115.
- Anonymous. Use of the term Vitamin P. *Nature*. (1950), 166, 543.
- Antebi, A. Genetics of aging in *Caenorhabditis elegans*. *Plos Genetics*. (2007), 3, e129.
- Argani, H.; Ghorbanihaghjo, A.; Vatankhahan, H.; Rashtchizadeh, N.; Raeisi, S.; Ilghami, H. The effect of red grape seed extract on serum paraoxonase activity in patients with mild to moderate hyperlipidemia. *Sao Paulo Med. J.* (2016), 134, 234–239.
- Arora, A.; Nair, M.G.; Strasburg, G.M. Structure-activity relationships for antioxidant activities of a series of flavonoids in a liposomal system. *Free Radic. Biol. Med.* (1998), 24, 1355–1363.
- Aura, A.M. Microbial metabolism of dietary phenolic compounds in the colon. *Phytochem Rev.* (2008), 7, 407–429.
- Ayuda-Durán, B. Mecanismos de acción implicados en la actividad biológica de compuestos fenólicos de la dieta: Evaluación en el organismo *Caenorhabditis elegans*. Tesis doctoral. Universidad de Salamanca, España (2018).
- Ayuda-Durán, B.; González-Manzano, S.; Miranda-Vizueté, A.; Dueñas, M.; Santos-Buelga, C.; González-Paramás, A.M. Epicatechin modulates stress-resistance in *C. elegans* via insulin/IGF-1 signaling pathway. *PLoS ONE*. (2019), 14, e0199483.
- Baeza, G.; Sarrià, B.; Mateo, R.; Bravo, L. Dihydrocaffeic acid, a major microbial metabolite of chlorogenic acids, shows similar protective effect than a yerba mate phenolic extract against oxidative stress in HepG2 cells. *Food Res Int.* (2016), 87, 25–33.

- Baird, N.A.; Douglas, P.M.; Simic, M.S.; Grant, A.R.; Moresco, J.J.; Wolff, S.C.; Yates, J.R.; Manning, G.; Dillin, A. HSF-1-mediated cytoskeletal integrity determines thermotolerance and life span. *Science*. (2014), 346, 360–363.
- Balzer, J.; Rassaf, T.; Heiss, C.; Kleinbongard, P.; Lauer, T.; Merx, M.; Heussen, N.; Gross, H.B.; Keen, C.L.; Schroeter, H.; Kelm, M. Sustained benefits in vascular function through flavanol- containing cocoa in medicated diabetic patients a double-masked, randomized, controlled trial. *Journal of the American College of Cardiology*. (2008), 51, 2141-2149.
- Bartholome, A.; Kampkötter, A.; Tanner, S.; Sies, H.; Klotz, L.O. Epigallocatechin gallate-induced modulation of FoxO signaling in mammalian cells and *C. elegans*: FoxO stimulation is masked via PI3K/Akt activation by hydrogen peroxide formed in cell culture. *Arch. Biochem. Biophys.* (2010), 501, 58-64.
- Bell, L.; Lamport, D.J.; Butler, L.T.; Williams, C.M. A review of the cognitive effects observed in humans following acute supplementation with flavonoids, and their associated mechanisms of action. *Nutrients*. (2015), 7, 10290-10306.
- Benthath, A., Rusznyak, S.T., Szent-György, A. Vitamin nature of flavones. *Nature*. (1936), 138, 798.
- Benthath, A.; Rusznyak, S.T.; Szent-Györgyi, A. Vitamin P. *Nature*. (1937), 139, 326-327.
- Berdichevsky, A.; Viswanathan, M.; Horvitz, H.R.; Guarente, L. *C. elegans* SIR-2.1 interacts with 14-3-3 proteins to activate DAF-16 and extend life span. *Cell*. (2006), 125, 1165-1177.
- Bird, A.F.; Bird, J. The structure of nematodes. S. Diego, CA: Academic Press. (1991).
- Blackwell, T.K.; Steinbaugh, M.J.; Hourihan, J.M.; Ewald, C.Y.; Isik, M. SKN-1/Nrf, stress responses, and aging in *Caenorhabditis elegans*. *Free Radic. Biol. Med.* (2015), 88, 290–301.
- Bonomo L.F.; Silva, D.N.; Boasquivis, P.F.; Paiva, F.A.; Guerra, J.F.; Martins, T.A.; Torres, A.G.J.; De Paula, I.B.R.; Caneschi, W.L.; Jacolot, P.; Grossin, N; Tessier, F.J.; Boulanger, E.; Silva, M.E.; Pedrosa, M.L.; Oliveira, R.P. Açai (*Euterpe oleracea* Mart.) modulates oxidative stress resistance in *Caenorhabditis elegans* by direct and indirect mechanisms. *PLoS One*. (2014), 9, e89933.

- Borges, F.; Guimaraes, C.; Lima, J.L.F.C.; Pinto, I.; Reis, S. Potentiometric studies on the complexation of copper (II) by phenolic acids as discrete ligand models of humic substances. *Talanta*. (2005), 66, 670-673.
- Bors, W.; Heller, W.; Michel, C.; Saran, M. Flavonoids as antioxidants: determination of radical scavenging efficiencies. *Methods Enzymol.* (1990), 186, 343–355.
- Boullata, J.I.; Hudson, L.M. Drug–nutrient interactions: a broad view with implications for practice. *J Acad Nutr Diet.* (2012), 112, 506-517.
- Braeckman, B.P.; Vanfleteren, J.R. Genetic control of longevity in *C. elegans*. *Experimental Gerontology.* (2007), 42, 90-98.
- Bravo, L. Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance. *Nutrition Reviews.* (1998), 56, 317–333.
- Brenner, S. The genetics of *Caenorhabditis elegans*. *Genetics.* (1974), 77, 71-94.
- Brüll, V.; Burak, C.; Stoffel-Wagner, B.; Wolfram, S.; Nickenig, G.; Müller, C.; Langguth, P.; Alteheld, B.; Fimmers, R.; Naaf, S.; Zimmermann, B.F.; Stehle, P.; Egert, S. Effects of a quercetin-rich onion skin extract on 24 h ambulatory blood pressure and endothelial function in overweight-to-obese patients with (pre-) hypertension: a randomised double-blinded placebo-controlled cross-over trial. *Br. J. Nutr.* (2015), 114, 1263-1277.
- Brunet, A.; Sweeney, L.B.; Sturgill, J.F.; Chua, K.F.; Greer, P.L.; Lin, Y.; Tran, H.; Ross, S.E.; Mostoslavsky, R.; Cohen, H.Y.; Hu, L.S.; Cheng, H.; Jedrychowski, M.P.; Gygi, S.P.; Sinclair, D.A.; Alt, F.W.; Greenberg, M.E. Stress-dependent regulation of FOXO transcription factors by the SIRT1 deacetylase. *Science.* (2004), 303, 2011-2015.
- Brunquell, J.; Morris, S.; Lu, Y.; Cheng, F.; Westerheide, S.D. The genome-wide role of HSF-1 in the regulation of gene expression in *Caenorhabditis elegans*. *BMC Genomics.* (2016), 17, 559.
- Büchter, C.; Ackermann, D.; Havermann, S.; Honnen, S.; Chovolou, Y.; Fritz, G.; Kampkötter, A.; Wätjen, W. Myricetin-mediated lifespan extension in *Caenorhabditis elegans* is modulated by DAF-16. *Int. J. Mol. Sci.* (2013), 14, 11895–11914.
- Buijsse, B.; Feskens, E.J.; Kok, F.J.; Kromhout, D. Cocoa intake, blood pressure, and cardiovascular mortality: the Zutphen Elderly Study. *Archives of Internal Medicine.* (2006), 166, 411-417.



- Byerly, L.; Cassada, R.C.; Russell, R.L. The life cycle of the nematode *Caenorhabditis elegans* I. Wild-type growth and reproduction. *Developmental Biology*. (1976), 51, 23-33.
- Cabreiro, F.; Ackerman, D.; Doonan, R.; Araiz, C.; Back, P.; Papp, D.; Braeckman, B.P.; Gems, D. Increased life span from overexpression of superoxide dismutase in *Caenorhabditis elegans* is not caused by decreased oxidative damage. *Free Radic. Biol. Med.* (2011), 51, 1575–1582.
- Cabrini, L.; Barzanti, V.; Cipollone, M.; Fiorentini, D.; Grossi, G.; Tolomelli, B.; Zamboni, L.; Landi, L. Antioxidants and Total Peroxyl Radical-Trapping Ability of Olive and Seed Oils. *J. Agric. Food Chem.* (2001), 49, 6026-6032.
- Calabrese, E.J.; Baldwin, L.A. Defining hormesis. *Hum. Exp. Toxicol.* (2002), 21, 91–97.
- Calisle, J.B. Data fabrication and other reasons for non-random sampling in 5087 randomised, controlled trials in anaesthetic and general medical journals. *Anaesthesia*. (2017), 72, 944-952.
- Calixto-Campos, C.; Carvalho, T.T.; Hohmann, M.S.N.; Pinho-Ribeiro, F.A.; Fattori, V.; Manchope, M.F.; Zarpelon, A.C.; Baracat, M.M.; Georgetti, S.R.; Casagrande, R.; Verri, W.A. Vanillic Acid Inhibits Inflammatory Pain by Inhibiting Neutrophil Recruitment, Oxidative Stress, Cytokine Production, and NFκB Activation in Mice. *J. Nat. Prod.* (2015), 78, 1799-1808.
- Cardona, F.; Andrés-Lacueva, C.; Tulipani, S.; Tinahones, F.J.; Queipo-Ortuño, M.I. Benefits of polyphenols on gut microbiota and implications in human health. *J. Nutr. Biochem.* (2013) 24, 1415–1422.
- Carpenter, R.L.; Paw, I.; Dewhirst, M.W.; Lo, H.W. Akt phosphorylates and activates HSF-1 independent of heat shock, leading to Slug overexpression and epithelial-mesenchymal transition (EMT) of HER2-overexpressing breast cancer cells. *Oncogene*. (2015), 34, 546–557.
- Carrasco-Pozo, C.; Gotteland, M.; Castillo, R.L.; Chen, C. 3,4-dihydroxyphenylacetic acid, a microbiota-derived metabolite of quercetin, protects against pancreatic β-cells dysfunction induced by high cholesterol. *Exp Cell Res.* (2015), 334, 270–282.
- Cassada, R.C.; Russell, R.L. The dauer larva, a postembryonic developmental variant of the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Dev. Biol.* (1975), 46, 326-342.

- Cassidy, A.; Hanley, B.; Lamuela-Raventos, R.M. Isoflavones, lignans and stilbenes – origins, metabolism and potential importance to human health. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. (2000), 80, 1044-1062.
- Chen, J.; Zhang, Z.; Cai L. Diabetic cardiomyopathy and its prevention by nrf2: current status. *Diabetes & Metabolism Journal*. (2014), 38, 337-345.
- Chen, M.; Rao, Y.; Zheng, Y.; Wei, S.; Li, Y.; Guo, T.; Yin, P. Association between soy isoflavone intake and breast cancer risk for pre- and post-menopausal women: A meta-analysis of epidemiological studies. *PLoS ONE*. (2014), 9, e89288.
- Chen, X.; Zhong, Z.; Xu, Z.; Chen, L.; Wang, Y. 2',7'-Dichlorodihydrofluorescein as a fluorescent probe for reactive oxygen species measurement: Forty years of application and controversy. *Free Radical Research*. (2010), 44, 587-604.
- Cheng, I.F.; Breen, K. On the ability of four flavonoids, baicalein, luteolin, naringenin, and quercetin, to suppress the Fenton reaction of the iron-ATP complex. *Biometals*. (2000), 13, 77-83.
- Cheng, S.C.; Li, W.H.; Shi, Y.C.; Yen, P.L.; Lin, H.Y.; Liao, V.H.; Chang, S.T. Antioxidant activity and delayed aging effects of hot water extract from *Chamaecyparis obtusa* var. *formosana* leaves. *J Agric Food Chem*. (2014), 62, 4159–4165.
- Cherrak, S.A.; Mokhtari-Soulimane, N.; Berroukeche, F.; Bensenane, B.; Cherbonnel, A.; Merzouk, H.; Elhabiri, M. *In vitro* antioxidant versus metal ion chelating properties of flavonoids: A structure-activity investigation. *PLoS ONE*. (2016), 11, e0165575.
- Chiang, W.C.; Ching, T.T.; Lee, H.C.; Mousigian, C.; Hsu, A.L. HSF-1 regulators DDL-1/2 link insulin-like signaling to heat-shock responses and modulation of longevity. *Cell*. (2012), 148, 322-334.
- Choi, E.Y.; Lee, H.; Woo, J.S.; Jang, H.H.; Hwang, S.J.; Kim, H.S.; Kim, W.S.; Kim, Y.S.; Choue, R.; Cha, Y.J.; Jim, J.E.; Kim, W. Effect of onion peel extract on endothelial function and endothelial progenitor cells in overweight and obese individuals. *Nutrition*. (2015), 31, 1131-1135.
- Chou, T.H.; Ding, H.Y.; Hung, W.J.; Liang, C.H. Antioxidative characteristics and inhibition of alpha-melanocyte-stimulating hormone-stimulated melanogenesis of vanillin and vanillic acid from *Origanum vulgare*. *Exp. Dermatol*. (2010a), 19, 742–750.

- Chou, T.H.; Ding, H.Y.; Lin, R.J.; Liang, J.Y.; Liang, C.H. Inhibition of melanogenesis and oxidation by protocatechuic acid from *Origanum vulgare* (oregano). *J. Nat. Prod.* (2010b), 73, 1767-1774.
- Christensen, K.Y.; Naidu, A.; Parent, M.E.; Pintos, J.; Abrahamowicz, M.; Siemiatycki, J.; Koushik, A. The risk of lung cancer related to dietary intake of flavonoids. *Nutr. Cancer.* (2012), 64, 964-974.
- Cicero, A.F.G.; Fogacci, F.; Banach, M. Botanicals and phytochemicals active on cognitive decline: The clinical evidence. *Pharmacol. Res.* (2018), 130, 204-212.
- Clifford, M.N. Diet-derived phenols in plasma and tissues and their implications for health. *Planta Med.* (2004), 70, 1103-1114.
- Corsi, A.K.; Wightman, B.; Chalfie, M. A Transparent window into biology: A primer on *Caenorhabditis elegans*. En *WormBook, the online review of C. elegans biology*. The *C. elegans* Research Community (Ed.). (2015), 1-31.
- Cox, M.; Blaser, M.J. Pathways in microbe-induced obesity. *Cell Metabolism.* (2013), 17, 883-894.
- Crozier, A.; Del Rio, D.; Clifford, M.N. Bioavailability of dietary flavonoids and phenolic compounds. *Molecular Aspects of Medicine.* (2010), 31, 446-467.
- Crozier, A.; Jaganath, I.B.; Clifford, M.N. Dietary phenolics: chemistry, bioavailability and effects on health. *Food & Function.* (2009), 26, 1001-1043.
- Cueva, C.; Gil-Sánchez, I.; Ayuda-Durán, B.; González-Manzano, S.; González-Paramás, A.M.; Santos-Buelga, C.; Bartolomé, B.; Moreno-Arribas, M.V. An integrated view of the effects of wine polyphenols and their relevant metabolites on gut and host health. *Molecules.* (2017), 22, 99.
- Czank, C.; Cassidy, A.; Zhang, Q.; Morrison, D.J.; Preston, T.; Kroon, P.A.; Botting, N.P.; Kay, C.D. Human metabolism and elimination of the anthocyanin, cyanidin-3-glucoside: a <sup>13</sup>C-tracer study. *Am. J. Clin. Nutr.* (2013), 97, 995–1003.
- Daitoku, H.; Hatta, M.; Matsuzaki, H.; Aratani, S.; Ohshima, T.; Miyagishi, M.; Nakajima, T.; Fukamizu, A. Silent information regulator 2 potentiates Foxo1-mediated transcription through its deacetylase activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* (2004). 101, 10042-10047.

- Damasceno, S.S.; Dantas, B.B.; Ribeiro-Filho, J.; Araújo, D.A.M.; da Costa, J.G.M. Chemical properties of caffeic and ferulic acids in biological system: implications in cancer therapy. A review. *Curr. Pharmaceut. Des.* (2017), 23, 3015-3023.
- D'Archivio, M.; Filesi, C.; Vari, R.; Scazzocchio, B.; Masella, R. Bioavailability of the Polyphenols: Status and Controversies. *Int. J. Mol. Sci.* (2010), 11, 1321–1342.
- Day, A.J.; Gee, J.M.; Dupont, M.S.; Johnson, I.T.; Williamson, G. Absorption of quercetin-3-glucoside and quercetin-4'-glucoside in the rat small intestine: the role of lactase phlorizin hydrolase and the sodium-dependent glucose transporter. *Biochemical Pharmacology.* (2003), 65, 1199–1206.
- De Ferrars, R.M.; Cassidy, A.; Curtis, P.; Kay, C.D. Phenolic metabolites of anthocyanins following a dietary intervention study in post-menopausal women. *Molecular Nutrition & Food Research.* (2014a), 58, 490-502.
- De Ferrars, R.M.; Czank, C.; Zhang, Q.; Botting, N.P.; Kroon, P.A.; Cassidy, A.; Kay, C.D. The pharmacokinetics of anthocyanins and their metabolites in humans. *British Journal of Pharmacology.* (2014b), 171, 3268-3282.
- De la Torre, M.R.; Casado, A.; Lopez-Fernandez, M.E.; Carrascosa, D.; Casado, M.C.; Venarucci, D.; Venarucci, V. Human aging brain disorders: role of antioxidant enzymes. *Neurochem. Res.* (1996), 21, 885-888.
- De Pascual-Teresa, S.; Moreno, D.A.; García-Viguera, C. Flavanols and anthocyanins in cardiovascular health: a review of current evidence. *International journal of Molecular Sciences.* (2010), 11, 1679-1703.
- Del Rio, D.; Rodríguez-Mateos, A.; Spencer, J.P.E.; Tognolini, M.; Borges, G.; Crozier, A. Dietary (Poly)phenolics in human health: structures, bioavailability, and evidence of protective effects against chronic diseases. *Antioxidants & Redox Signaling.* (2013), 18, 1818-1891.
- Delgado-Ciruelos, L. Mecanismos de acción implicados en la bioactividad de flavonoides. *Caenorhabditis elegans* y líneas celulares como sistemas modelo. Tesis doctoral. Universidad de Salamanca, España (2015).
- Deusing, D.J.; Beyrer, M.; Fitzenberger, E.; and Wenzel, U. Carnitine protects the nematode *Caenorhabditis elegans* from glucose-induced reduction of survival depending on the nuclear hormone receptor DAF-12. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* (2015), 460, 747–752.

- Diebolt, M.; Bucher, B.; Andriantsitohaina, R. Wine polyphenols decrease blood pressure, improve NO vasodilatation, and induce gene expression. *Hypertension*. (2001), 38, 159-165.
- Dikalov, S.I.; Harrison, D.G. Methods for detection of mitochondrial and cellular reactive oxygen species *Antioxidants & Redox Signaling*. (2014), 20, 72-382.
- Dong, X.; Liu, O.W.; Howell, A.S.; Shen, K. An extracellular adhesion molecule complex patterns dendritic branching and morphogenesis. *Cell*. (2013), 155, 296-307.
- Dong, Y.; Guha, S.; Sun, X.; Cao, M.; Wang, X.; Zou, S. Nutraceutical interventions for promoting healthy aging in invertebrate models. *Oxid. Med. Cell. Longev*. (2012), 718491.
- Dos Santos Nunes, R.G.; Pereira, P.S.; Elekofehinti, O.O.; Fidelis, K.R.; da Silva, C.S.; Ibrahim, M.; Barros, L.M.; da Cunha, F.A.B.; Lukong, K.E.; de Menezes, I.R.A.; Tsopmo, A.; Duarte, A.E.; Kamdem, J.P. Possible involvement of transcriptional activation of nuclear factor erythroid 2-related factor 2(Nrf2) in the protective effect of caffeic acid on paraquat-induced oxidative damage in *Drosophila melanogaster*. *Pestic Biochem Physiol*. (2019), 157, 161-168.
- Drezner, H.L.; Edwards, W.; Warter, P.J.; Horoschak, S. Capillary integrity; a review and interim report after five-year study of use of hesperidin-C. *American Practitioner and Digest of Treatment*. (1955), 6, 912-919.
- Duarte, G.S.; Farah, A. Effect of simultaneous consumption of milk and coffee on chlorogenic acids bioavailability in humans. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. (2011), 59, 7925–7931.
- Dudylyna, A.L.; Ivanova, M.V.; Shumaev, K.B.; Ruuge, E.K. Superoxide Formation in Cardiac Mitochondria and Effect of Phenolic Antioxidants. *Cell Biochem Biophys*. (2019), 77, 99-107.
- Dueñas, M.; Cueva, C.; Muñoz-González, I.; Jiménez-Girón, A.; Sánchez-Patán, F.; Santos-Buelga, C.; Moreno-Arribas, M.V.; Bartolomé, B. Studies on modulation of gut microbiota by wine polyphenols: from isolated cultures to omic approaches. *Antioxidants*. (2015), 4, 1-21.
- Dueñas, M.; González-Manzano, S.; González-Paramás, A.; Santos-Buelga, C. Antioxidant evaluation of O-methylated metabolites of catechin, epicatechin and quercetin. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. (2010), 51, 443-449.

- Dueñas, M.; Surco-Laos, F.; González-Manzano, S.; González-Paramás, A.M.; Gómez-Orte, E.; Cabello, J.; Santos-Buelga, C. Deglycosylation is a key step in biotransformation and lifespan effects of quercetin-3-O-glucoside in *Caenorhabditis elegans*. *Pharmacological research*. (2013), 76, 41-8.
- Dueñas, M.; Surco-Laos, F.; González-Manzano, S.; González-Paramás, A.M.; Santos-Buelga, C. Antioxidant properties of major metabolites of quercetin. *Eur. Food Res. Technol.* (2011), 232, 103–111.
- Estruch, R.; Ros, E.; Salas-Salvadó, J.; Covas, M.I.; Corella, D.; Arós, F.; Gómez-Gracia, E.; Ruiz-Gutiérrez, V.; Fiol, M.; Lapetra, J.; Lamuela-Raventos, R.M.; Serra-Majem, L.; Pintó, X.; Basora, J.; Muñoz, M.A.; Sorlí, J.V.; Martínez, J.A.; Martínez-González, M.A. Retraction and republication: primary prevention of cardiovascular disease with a mediterranean diet. *N Engl J Med* 2013; 368: 1279-90. *The New England journal of medicine*. (2018a), 378, 2441-2442.
- Estruch, R.; Ros, E.; Salas-Salvadó, J.; Covas, M.I.; Corella, D.; Arós, F.; Gómez-Gracia, E.; Ruiz-Gutiérrez, V.; Fiol, M.; Lapetra, J.; Lamuela-Raventos, R.M.; Serra-Majem, L.; Pintó, X.; Basora, J.; Muñoz, M.A.; Sorlí, J.V.; Martínez, J.A.; Fitó, M.; Gea, A.; Hernán, J.A.; Martínez-González, M.A. Primary prevention of cardiovascular disease with a mediterranean diet supplemented with extra-virgin olive oil or nuts. *The New England journal of medicine*. (2018b), 378, e34.
- Estruch, R.; Ros, E.; Salas-Salvadó, J.; Covas, M.I.; Corella, D.; Arós, F.; Gómez-Gracia, E.; Ruiz-Gutiérrez, V.; Fiol, M.; Lapetra, J.; Lamuela-Raventos, R.M.; Serra-Majem, L.; Pintó, X.; Basora, J.; Muñoz, M.A.; Sorlí, J.V.; Martínez, J.A.; Martínez-González, M.A. Primary Prevention of Cardiovascular Disease with a Mediterranean Diet. *New England Journal of Medicine*. (2013), 368, 1279-1290.
- Etxeberria, U.; Arias, N.; Boqué, N.; Macarulla, M.T.; Portillo, M.P.; Martínez, J.A.; Milagro, F.I. Reshaping faecal gut microbiota composition by the intake of *trans*-resveratrol and quercetin in high-fat sucrose diet-fed rats. *The Journal of Nutritional Biochemistry*. (2015), 26, 651–660.
- Feliciano, R.P.; Mills, C.E.; Ista, G.; Heiss, C.; Rodriguez-Mateos, A. Absorption, metabolism and excretion of cranberry (poly)phenols in humans: a dose response study and assessment of inter-individual variability. *Nutrients*. (2017), 9, 268.
- Fraga, C.G.; Croft, K.D.; Kennedy, D.O.; Tomás-Barberán, F.A. The effects of polyphenols and other bioactives on human health. *Food Funct.* (2019), 10, 514-528.

- Fraga, C.G.; Galleano, M.; Verstraeten, S.V.; Oteiza, P.I. Basic biochemical mechanisms behind the health benefits of polyphenols. *Molecular aspects of medicine*. (2010), 31, 435-45.
- Frank, J.; Budek, A.; Lundh, T.; Parker, R.S.; Swanson, J.E.; Lourenço, C.F.; Gago, B.; Laranjinha, J.; Vessby, B.; Kamal-Eldin A. Dietary flavonoids with a catechol structure increase alpha- tocopherol in rats and protect the vitamin from oxidation *in vitro*. *Journal of Lipid Research*. (2006), 47, 2718-2725.
- Fujiki, H.; Sueoka, E.; Watanabe, T.; Suganuma, M. Primary cancer prevention by green tea, and tertiary cancer prevention by the combination of green tea catechins and anticancer compounds. *J Cancer Prev*. (2015), 20, 1-4.
- Fujimoto, M.; Takaki E.; Hayashi, T.; Kitaura, Y.; Tanaka, Y.; Inouye, S.; Nakai, A. Active HSF1 significantly suppresses polyglutamine aggregate formation in cellular and mouse models. *J. Biol. Chem*. (2005), 280, 34908–34916.
- Furuyama, T.; Nakazawa, T.; Nakano, I.; Mori, N. Identification of the differential distribution patterns of mRNAs and consensus binding sequences for mouse DAF-16 homologues. *The Biochemical Journal*. (2000), 349, 629-34.
- Gao, K.; Xu, A.; Krul, C.; Venema, K.; Liu, Y.; Niu, Y.; Lu, J.; Bensoussan, L.; Seeram, N.P.; Heber, D.; Henning, S.M. Of the major phenolic acids formed during human microbial fermentation of tea, citrus, and soy flavonoid supplements, only 3,4-dihydroxyphenylacetic acid has antiproliferative activity. *Journal of Nutrition*. (2006), 136, 52-57.
- García, P.; Romero, C.; Brenes, M. Bioactive substances in black ripe olives produced in Spain and the USA. *Journal of Food Composition and Analysis*. (2018), 66, 193-198.
- Giovannini, C.; Scazzocchio, B.; Matarrese, P.; Vari, R.; D'Archivio, M.; Di Benedetto, R.; Casciani, S.; Dessi, M.R.; Straface, E.; Malorni, W.; Masella, R. Apoptosis induced by oxidized lipids is associated with up-regulation of p66Shc in intestinal Caco-2 cells: protective effects of phenolic compounds. *J. Nutr. Biochem*. (2008), 19, 118-128.
- Gomez-Pastor, R.; Burchfiel, E.T.; Thiele, D.J. Regulation of heat shock transcription factors and their roles in physiology and disease. *Nat Rev Mol Cell Biol*. (2018), 19, 4–19.

- Gonthier, M.P.; Remesy, C.; Scalbert, A.; Cheynierb, V.; Souquetb, J.M.; Poutanenc, K.; Aura, A.M. Microbial metabolism of caffeic acid and its esters chlorogenic and caffeic acids by human faecal microbiota *in vitro*. *Biomed Pharmacother.* (2006), 60, 536–540.
- González-Manzano, S.; González-Paramás, A.; Santos-Buelga, C.; Dueñas, M. Preparation and characterization of catechin sulfates, glucuronides, and methylethers with metabolic interest. *J. Agric. Food Chem.* (2009), 57, 1231-1238.
- González-Manzano, S.; González-Paramás, A.M.; Delgado, L.; Patianna, S.; Surco-Laos, F.; Dueñas, M.; Santos-Buelga, C. Oxidative status of stressed *Caenorhabditis elegans* treated with epicatechin. *J. Agric. Food Chem.* (2012), 60, 8911-8916.
- González-Paramás, A.M.; Ayuda-Durán, B.; Martínez, S.; González-Manzano, S.; Santos-Buelga, C. The Mechanisms behind the Biological Activity of Flavonoids. *Curr. Med. Chem.* (2019), 26, 1-14.
- González-Sarrías, A.; Núñez-Sánchez, M.A.; Tomás-Barberán, F.A.; Espín, J.C. Neuroprotective effects of bioavailable polyphenol-derived metabolites against oxidative stress-induced Cytotoxicity in human neuroblastoma SHSY5Y cells. *J. Agric. Food Chem.* (2017), 65, 752–758.
- Gopalakrishnan, A.; Kong, A.N.T. Anticarcinogenesis by dietary phytochemicals: cytoprotection by Nrf2 in normal cells and cytotoxicity by modulation of transcription factors NFkappa B and AP-1 in abnormal cancer cells. *Food Chem Toxicol.* (2008), 46,1257-1270.
- Grant, B.D.; Sato, M. Intracellular trafficking. En *WormBook, the online review of C. elegans biology*. The *C. elegans* Research Community (Ed.). (2006), 1-9.
- Grosso, G.; Stepaniak, U.; Topor-Mądry, R.; Szafraniec, K.; Pająk, A. Estimated dietary intake and major food sources of polyphenols in the Polish arm of the HAPIEE study. *Nutrition.* (2014), 30, 1398–1403.
- Grünz, G.; Haas, K.; Soukup, S.; Klingenspor, M.; Kulling, S.E.; Daniel, H.; Spanier, B. Structural features and bioavailability of four flavonoids and their implications for lifespan-extending and antioxidant actions in *C. elegans*. *Mech. Ageing Dev.* (2012), 133, 1-10.



- Guan, S.; Ge, D.; Liu, T.Q.; Ma, X.H.; Cui, Z.F. Protocatechuic acid promotes cell proliferation and reduces basal apoptosis in cultured neural stem cells. *Toxicol In Vitro*. (2009), 23, 201–208.
- Guan, S.; Jiang, B.; Bao, Y.M.; An, L.J. Protocatechuic acid suppresses MPP<sup>+</sup> -induced mitochondrial dysfunction and apoptotic cell death in PC12 cells. *Food Chem. Toxicol.* (2006), 44, 1659-1666.
- Guo, R.; Li, W.; Liu, B.; Li, S.; Zhang, B.; Xu, Y. Resveratrol protects vascular smooth muscle cells against high glucose-induced oxidative stress and cell proliferation *in vitro*. *Med Sci Monit Basic Res.* (2014), 20, 82–92.
- Haber, F.; Weiss, J. The Catalytic Decomposition of Hydrogen Peroxide by Iron. *Salts Proc. R. Soc. London, Ser. A.* (1934), 147, 332– 351.
- Haller, S.; Montandon, M.L.; Rodriguez, C.; Herrmann, F.; Giannakopoulos, P. Impact of Coffee, Wine, and Chocolate Consumption on Cognitive Outcome and MRI Parameters in Old Age. *Nutrients.* (2018), 10, 1391.
- Halliwell, B. Are polyphenols antioxidants or pro-oxidants? What do we learn from cell culture and *in vivo* studies? *Arch. Biochem. Biophys.* (2008), 476, 107–112.
- Halliwell, B.; Gutteridge, J.M.C. Free radicals in biology and medicine. Third ed. Oxford: Oxford University Press. (1998).
- Harman, D. Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry. *J. Gerontol.* (1956), 11, 298-300.
- Hartl, F.U. Heat shock proteins in protein folding and membrane translocation. *Semin. Immunol.* (1991), 3, 5-16.
- Havermann, S.; Chovolou, Y.; Humpf, H.U.; Wätjen, W. Caffeic acid phenethyl ester increases stress resistance and enhances lifespan in *Caenorhabditis elegans* by modulation of the insulin-like DAF-16 signalling pathway. *PLoS One.* (2014), 9, e100256.
- Hayyan, M.; Hashim, M.A.; AlNashef, I.M. Superoxide Ion: Generation and Chemical Implications. *Chem. Rev.* (2016), 116, 3029-3085.
- Heim, K.E.; Tagliaferro, A.R.; Bobilya, D.J. Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships. *The Journal of Nutritional Biochemistry.* (2002), 13, 572-584.

- Heise, K.; Puntarulo, S.; Portner, H.O.; Abele, D. Production of reactive oxygen species by isolated mitochondria of the Antarctic bivalve *Laternula elliptica* (King and Broderip) under heat stress. *Comp. Biochem. Physiol. C. Toxicol. Pharmacol.* (2003), 134, 79-90.
- Heleno, S.A.; Martins, A.; Queiroz, M.J.R.P.; Ferreira, I.C.F.R. Bioactivity of phenolic acids: metabolites versus parent compounds: a review. *Food Chem.* (2015), 173, 501-513.
- Hertog, M.G.; Feskens, E.J.; Hollman, P.C.; Katan, M.B.; Kromhout, D. Dietary antioxidant flavonoids and risk of coronary heart disease: The Zutphen elderly study. *Lancet.* (1993), 342, 1007-1011.
- Hertog, M.G.; Kromhout, D.; Aravanis, C.; Blackburn, H.; Buzina, R.; Fidanza, F.; Giampaoli, S.; Jansen, A.; Menotti, A.; Nedeljkovic, S.; Pekkarinen, M.; Simic, B.S.; Toshima, H.; Feskens, E.J.M.; Hollman, P.C.H.; Katan, M.B. Flavonoid intake and long-term risk of coronary heart disease and cancer in the seven countries study. *Archives of Internal Medicine.* (1995), 155, 381-386.
- Hertzog, D.I.; Tica, O-S. Molecular mechanisms underlying the anti-cancerous action of flavonoids. *Current Health Sci. J.* (2012), 38, 145-149.
- Hervert-Hernández, D.; Pintado, C.; Rotger, R.; Goñi, I. Stimulatory effect of grape pomace polyphenols on *Lactobacillus acidophilus* growth. *International Journal of Food Microbiology.* (2009), 136, 119-122.
- Heschl, M.F.P.; Baillie, D.L. Characterization of the hsp70 multigene family of *Caenorhabditis elegans*. *DNA.* (1989), 233-243.
- Hodgkin J. Introduction to genetics and genomics. En *WormBook, the online review of C. elegans biology*. The *C. elegans* Research Community (Ed.). (2005), 1-3.
- Hodgkin, J. Sexual dimorphism and sex determination. En *The nematode C. elegans*. Wood, W.B. (Ed.). New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor. (1988), 9, 243-279.
- Hooper, L.; Kay, C.; Abdelhamid, A.; Kroon, P.A.; Cohn, J.S.; Rimm, E.B.; Cassidy, A. Effects of chocolate, cocoa, and flavan-3-ols on cardiovascular health: a systematic review and meta-analysis of randomized trials. *The American Journal of Nutrition.* (2012), 95, 740-751.

- Hope, I.A. *C. elegans*. A practical approach. The practical approach series: University of Leeds Oxford. (1999).
- Hosono, R. Sterilization and growth inhibition of *Caenorhabditis elegans* by 5-fluorodeoxyuridine. *Experimental Gerontology*. (1978) 13, 369-374.
- Hsu, A.; Coleen, T.; Kenyon, C. Regulation of aging and age-related disease by DAF-16 and heat-shock factor. *Science*. (2003), 300, 1142-1145.
- Hsu, C.C.; Hsu, C.L.; Tsai, S.E.; Fu, T.Y.; Yen, G.C. Protective effect of *Millettia reticulata* Benth against CCl<sub>4</sub>-induced hepatic damage and inflammatory action in rats. *J. Med. Food*. (2009), 12, 821-828.
- Hu, Q.; Yuan, B.; Xiao, H.; Zhao, L.; Wu, X.; Rakariyatham, K.; Zhong, L.; Han, Y.; Muinde Kimatu, B.; Yang, W. Polyphenols-rich extract from *Pleurotus eryngii* with growth inhibitory of HCT116 colon cancer cells and anti-inflammatory function in RAW264.7 cells. *Food Funct*. (2018), 29, 1601–1611.
- Huang, J.; de Paulis, T.; May, J.M. Antioxidant effects of dihydrocaffeic acid in human EA.hy926 endothelial cells. *J Nutr Biochem*. (2004), 15, 722–729.
- Jaganath, I.B.; Crozier, A. Dietary flavonoids and phenolic compounds. En *Plant phenolics and human health: biochemistry, nutrition, and pharmacology*. Fraga, C.G. (Ed.), USA: John Wiley & Sons: Hoboken NJ. (2010), 1-48.
- Jaganath, I.B.; Mullen, W.; Edwards, C.A.; Crozier, A. The relative contribution of the small and large intestine to the absorption and metabolism of rutin in man. *Free Radic Res*. (2006), 40, 1035–1046.
- Jaganath, I.B.; Mullen, W.; Lean, M.E.; Edwards, C.A.; Crozier, A. *In vitro* catabolism of rutin by human fecal bacteria and the antioxidant capacity of its catabolites. *Free Radical Biology & Medicine*. (2009), 47, 1180-1189.
- Jaul, E.; Barron, J. Age-Related Diseases and Clinical and Public Health Implications for the 85 Years Old and Over Population. *Front. Public Heal*. (2017), 5, 335.
- Jin, G.; Asou, Y.; Ishiyama, K.; Okawa, A.; Kanno, T.; Niwano, Y. Proanthocyanidin-rich grape seed extract modulates intestinal microbiota in ovariectomized mice. *Journal of Food Science*. (2018), 83, 1149-1152.
- Jorgensen, E.M.; Mango, S.E. The art and design of genetic screens: *Caenorhabditis elegans*. *Nature Rev. Genet*. (2002), 3, 356–369.

- Kakkar, S.; Bais, S. A review on protocatechuic acid and its pharmacological potential. *ISRN Pharmacology*. (2014), 952943, 1-9.
- Kaletta, T.; Hengartner, M.O. Finding function in novel targets: *C. elegans* as a model organism. *Nature Reviews. Drug Discovery*. (2006), 5, 387-399.
- Kampkötter, A.; Nkwonkam, C.G.; Zurawski, R.F.; Timpel, C.; Chovolou, Y.; Wätjen, W.; Kahl R. Effects of the flavonoids kaempferol and fisetin on thermotolerance, oxidative stress and FoxO transcription factor DAF-16 in the model organism *Caenorhabditis elegans*. *Archives of Toxicology*. (2007a), 81, 849-858.
- Kampkötter, A.; Nkwonkam, C.G.; Zurawski, R.F.; Timpel, C.; Chovolou, Y.; Wätjen, W.; Kahl R. Investigations of protective effects of the flavonoids quercetin and rutin on stress resistance in the model organism *Caenorhabditis elegans*. *Toxicology*. (2007b), 234, 113-123.
- Kampkötter, A.; Timpel, C.; Zurawski, R.F.; Ruhl, S.; Chovolou, Y.; Proksch, P.; Wätjen, W. Increase of stress resistance and lifespan of *Caenorhabditis elegans* by quercetin. *Comparative Biochemistry and Physiology. Part B, Biochemistry & Molecular Biology*. (2008), 149, 314-323.
- Kawabata, K.; Sugiyama, Y.; Sakano, T.; Ohigashi, H. Flavonols enhanced production of anti-inflammatory substance(s) by *Bifidobacterium adolescentis*: Prebiotic actions of galangin, quercetin, and fisetin. *BioFactors*. (2013), 39, 422–429.
- Kawabata, K.; Yoshioka, Y.; Terao, J. Role of Intestinal Microbiota in the Bioavailability and Physiological Functions of Dietary Polyphenols. *Molecules*. (2019), 24, 370.
- Kemperman, R.A.; Bolca, S.; Roger, L.C.; Vaughan, E.E. Novel approaches for analyzing gut microbes and dietary polyphenols: challenges and opportunities. *Microbiology*. (2010), 156, 3224-3231.
- Kern, A.; Ackermann, B.; Clement, A.M.; Duerk, H.; Behl, C. HSF1-controlled and age-associated chaperone capacity in neurons and muscle cells of *C. elegans*. *PLoS One*. (2010), 5, e8568.
- Khan, A.K.; Rashid, R.; Fatima, N.; Mahmood, S.; Mahmood, S.; Mir, S.; Khan, S.; Jabeen, N.; Murtaza, G. Pharmacological activities of protocatechuic acid. *Acta Poloniae Pharmaceutica*. (2015), 72, 643-650.

- Kim, K.K.; Kim, R.; Kim, S.H. Crystal structure of a small heat-shock protein. *Nature*. (1998), 394, 595-599.
- Kim, Y.S.; Seo, H.W.; Kim, D.K.; Jeon, H.; Cha, D.S. Protocatechuic acid extends lifespan and increases stress resistance in *Caenorhabditis elegans*. *Archives of Pharmacal Research*. (2014), 37, 245-252.
- Koch, K.; Havermann, S.; Büchter, C.; Wätjen, W. *Caenorhabditis elegans* as model system in pharmacology and toxicology: Effects of flavonoids on redox-sensitive signalling pathways and ageing. *Sci. World J.* (2014), 920398.
- Koch, K.; Weldle, N.; Baier, S.; Büchter, C.; Wätjen, W. *Hibiscus sabdariffa* L. extract prolongs lifespan and protects against amyloid- $\beta$  toxicity in *Caenorhabditis elegans*: involvement of the FoxO and Nrf2 orthologues DAF-16 and SKN-1. *Eur J Nutr.* (2019), 1-14.
- Koli, R.; Erlund, I.; Jula, A.; Marniemi, J.; Mattila, P.; Alfthan, G. Bioavailability of various polyphenols from a diet containing moderate amounts of berries. *J Agric Food Chem.* (2010), 58, 3927–3932.
- Kroon, P.A., Clifford, M.N., Crozier, A., Day, A.J., Donovan, J.L., Manach, C., Williamson, G. How should we assess the effects of exposure to dietary polyphenols in vitro? *Am. J. Clin. Nutr.* (2004), 80, 15-21.
- Kühnau, J. The flavonoids. A class of semi-essential food components: their role in human nutrition. *World Rev. Nutr. Diet.* (1976), 24, 117-191.
- Kumar, S.; Prahalathan, P.; Raja, B. Vanillic acid: a potential inhibitor of cardiac and aortic wall remodeling in I-NAME induced hypertension through upregulation of endothelial nitric oxide synthase. *Environmental Toxicology and Pharmacology.* (2014), 38, 643–652.
- Kumsta, C.; Ching, T.T.; Nishimura, M.; Davis, A.E.; Gelino, S.; Catan, H.H.; Yu, X.; Chu, C.C.; Ong, B.; Panowski, S.H.; Baird, N.; Bodmer, R.; Hsu, A.L.; Hansen, M. Integrin-linked kinase modulates longevity and thermotolerance in *C. elegans* through neuronal control of HSF-1. *Aging Cell.* (2014), 13, 419–430.
- Labuschagne, C.F.; Brenkman, A.B. Current methods in quantifying ROS and oxidative damage in *Caenorhabditis elegans* and other model organism of aging. *Ageing Research Reviews.* (2013), 12, 918–930.

- Lapierre, L.R.; Hansen, M. Lessons from *C. elegans*: signaling pathways for longevity. *Trends in Endocrinology and Metabolism*. (2012), 23, 637-644.
- Lee, H.C.; Jenner, A.M.; Low, C.S.; Lee, Y.K. Effect of tea phenolics and their aromatic fecal bacterial metabolites on intestinal microbiota. *Res Microbiol*. (2006), 157, 876–884.
- Lee, K.; Lee, B.J.; Bu, Y. Protective effects of dihydrocaffeic acid, a coffee component metabolite, on a focal cerebral ischemia rat model. *Molecules*. (2015), 20, 11930–11940.
- Leopoldini, M.; Russo, N.; Toscano, M. The molecular basis of working mechanism of natural polyphenolic antioxidants. *Food Chem*. (2011), 125, 288–306.
- Li, J.; Lin, S.; Vanhoutte, P.M.; Woo, C.W.; Xu, A. Akkermansia muciniphila Protects Against Atherosclerosis by Preventing Metabolic Endotoxemia-Induced Inflammation in Apoe<sup>-/-</sup> Mice. *Circulation*. (2016), 133, 2434-2446.
- Li, X.; Wang, X.; Chen, D.; Chen, S. Antioxidant activity and mechanism of protocatechuic acid *in vitro*. *Functional Foods in Health and Disease*. (2011), 7, 232–244.
- Lin, H.H.; Chen, J.H.; Huang, C.C.; Wang, C.J. Apoptotic effect of 3,4-dihydroxybenzoic acid on human gastric carcinoma cells involving JNK/p38 MAPK signalling activation. *Int J Cancer*. (2007), 120, 2306–2316.
- Liu, J.; Visser-Grieve, S.; Boudreau, J.; Yeung, B.; Lo, S.; Chamberlain, G.; Yu, F.; Sun, T.; Papanicolaou, T.; Lam, A.; Yang, X.; Chin-Sang, I. Insulin activates the insulin receptor to downregulate the PTEN tumour suppressor. *Oncogene*. (2014). 33, 3878–3885.
- Livak, K.J.; Schmittgen, T.D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2<sup>-</sup> $\Delta\Delta$ CT method. *Methods*. (2001), 25, 402-408.
- Losada-Barreiro, S.; Bravo-Díaz, C. Free radicals and polyphenols: The redox chemistry of neurodegenerative diseases. *European Journal of Medicinal Chemistry*. (2017), 133, 379-402.
- Lü, J.M.; Lin, P.H.; Yao, Q.; Chen, C. Chemical and molecular mechanisms of antioxidants: experimental approaches and model systems. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*. (2010), 14, 840-860.

- Manach, C.; Scalbert, A.; Morand, C.; Remesy, C.; Jimenez, L. Polyphenols: food sources and bioavailability. *Am. J. Clin. Nutr.* (2004), 79, 727-747.
- Mansuri, M.L.; Parihar, P.; Solanki, I.; Parihar, M.S. Flavonoids in modulation of cell survival signalling pathways. *Genes Nutr.* (2014), 9, 400.
- Marín, L.; Miguélez, E.M.; Villar, C.J.; Lombó, F. Bioavailability of dietary polyphenols and gut microbiota metabolism: antimicrobial properties. *BioMed Research International.* (2015), 905215.
- Martinez-Finley, E.J.; Chakraborty, S.; Slaughter, J.C.; Aschner, M. Early-life exposure to methylmercury in wildtype and pdr-1/parkin knockout *C. elegans*. *Neurochemical Research.* (2013), 38, 1543-52.
- Martorell, P.; Forment, J.V.; De Llanos, R.; Montón, F.; Llopis, S.; González, N.; Genovés, S.; Cienfuegos, E.; Monzó, H.; Ramón, D. Use of *Saccharomyces cerevisiae* and *Caenorhabditis elegans* as model organisms to study the effect of cocoa polyphenols in the resistance to oxidative stress. *J. Agric. Food Chem.* (2011), 59, 2077–2085.
- Masella, R.; Santangelo, C.; D'Archivio, M.; Li Volti, G.; Giovannini, C.; Galvano, F. Protocatechuic acid and human disease prevention: biological activities and molecular mechanisms. *Curr Med Chem.* (2012), 19, 2901-2917.
- Masella, R.; Vari, R.; D'Archivio, M.; Di Benedetto, R.; Matarrese, P.; Malorni, W.; Scazzocchio, B.; Giovannini, C. Extra virgin olive oil biophenols inhibit cell-mediated oxidation of LDL by increasing the mRNA transcription of glutathione-related enzymes. *J. Nutr.* (2004), 134, 785-791.
- Maupas, E. Modes et formes de reproduction des nématodes. *Arch. Zool. Exp. Gen.* (1900), 8, 463-624.
- McCullough, M.L.; Chevaux, K.; Jackson, L.; Preston, M.; Martinez, G.; Schmitz, H.H.; Coletti, C.; Campos, H.; Hollenberg, N.K. Hypertension, the Kuna, and the epidemiology of flavanols. *Journal of Cardiovascular Pharmacology.* (2006), 47, 103-109.
- McKay, D.L.; Chen, C.Y.O.; Zampariello, C.A.; Blumberg, J.B. Flavonoids and phenolic acids from cranberry juice are bioavailable and bioactive in healthy older adults. *Food Chem.* (2015), 168, 233–240.

- Mendenhall, A.R.; Tedesco, P.M.; Taylor, L.D.; Lowe, A.; Cypser, J. R.; Johnson, T. E. Expression of a single-copy hsp-16.2 reporter predicts life span. *J. Gerontol: Series A.* (2012), 67, 726-733.
- Metodiewa, D.; Jaiswal, A.K.; Cenas, N.; Dickançaité, E.; Segura-Aguilar, J. Quercetin may act as a cytotoxic prooxidant after its metabolic activation to semiquinone and quinoidal product. *Free Radic. Biol. Med.* (1999), 26, 107–116.
- Miene, C.; Weise, A.; Gleib, M. Impact of polyphenol metabolites produced by colonic microbiota on expression of COX-2 and GSTT2 in human colon cells (LT97). *Nutr. Cancer.* (2011), 63, 653–662.
- Mihaylova, V.T.; Borland, C.Z.; Manjarrez, L.; Stern, M.J.; Sun, H. The PTEN tumor suppressor homolog in *C. elegans* regulates longevity and dauer formation in an insulin receptor-like signaling pathway. *Proc Natl Acad Sci USA.* (1999), 96, 7427–7432.
- Mitchell, D.H.; Stiles, J.W.; Santelli, J.; Sanadi, D.R. Synchronous growth and aging of *Caenorhabditis elegans* in the presence of fluorodeoxyuridine. *The journal of Gerontology.* (1979), 34, 28-36.
- Morand, C.; Barber-Chamoux, N.; Monfoulet, L.; Milenkovic, D. Dietary (Poly)Phenols and Vascular Health. En *Recent Advances in Polyphenol Research*. Edited by Halbwirth, H.; Stich, K.; Cheynier, V.; Quideau, S. (Eds.). John Wiley & Sons: Oxford, United Kingdom. (2019), 127-148.
- Moreno-Arriola, E.; Cardenas-Rodriguez, N.; Coballase-Urrutia, E.; Pedraza-Chaverri, J.; Carmona-Aparicio, L.; Ortega-Cuellar, D. *Caenorhabditis elegans*: A useful model for studying metabolic disorders in which oxidative stress is a contributing factor. *Oxid Med Cell Longev.* (2014), 705253.
- Morley, J.F.; Morimoto, R.I. Regulation of longevity in *Caenorhabditis elegans* by heat shock factor and molecular chaperones. *Molecular Biology of the Cell.* (2004), 15, 657-664.
- Motta, M.C.; Divecha, N.; Lemieux, M.; Kamel, C.; Chen, D.; Gu, W.; Bultsma, Y.; McBurney, M.; Guarente, L. Mammalian SIRT1 represses forkhead transcription factors. *Cell.* (2004), 116, 551-563.
- Muller, F.L.; Lustgarten, M.S.; Jang, Y.; Richardson, A.; Van, Remmen. Trends in oxidative aging theories. *Free Radic. Biol. Med.* (2007), 43, 477–503.



- Mullis, K.; Faloona, F.; Scharf, S.; Saiki, R.; Horn, G.; Erlich, H. Specific enzymatic amplification of DNA *in vitro*: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*. (1986), 51, 1, 263-273.
- Murphy, C.T.; Hu, P.J. Insulin/insulin-like growth factor signaling in *C. elegans*. En *WormBook*. The *C. elegans* Research Community (Ed.). (2013), 1-43.
- Murphy, C.T.; McCarroll, S.A.; Bargmann, C.; Fraser, A.; Kamath, R.S.; Ahringer, J.; Li, H.; Kenyon, C. Genes that act downstream of DAF-16 to influence the lifespan of *Caenorhabditis elegans*. *Nature*. (2003), 424, 277-283.
- Myhre, O.; Andersena, J.M.; Aarnesc, H.; Fonnum, F. Evaluation of probes 2',7'-dichlorofluorescein diacetate, luminol, and lucigenin as indicators of reactive species formation. *Biochemical Pharmacology*. (2003), 65, 1575-1582.
- Nakamura, Y.; Torikai, K.; Ohigashi, H. Toxic dose of a simple phenolic antioxidant, protocatechuic acid, attenuates the glutathione level in ICR mouse liver and kidney. *J. Agric. Food Chem.* (2001), 49, 5674-5678.
- Nelson, F.K.; Riddle, D.L. Functional study of the *Caenorhabditis elegans* secretory excretory system using laser microsurgery. *The Journal of Experimental Zoology*. (1984), 231, 45-56.
- Németh, K.; Plumb, G.W.; Berrin, J.G.; Juge, N.; Jacob, R.; Naim, H.Y.; Williamson, G.; Swallow, D.M.; Kroon, P.A. *European Journal of Nutrition*. (2003), 42, 29–42.
- Nguyen, T.; Nioj, P.; Pickett, C.B. The Nrf2-antioxidant response element signaling pathway and its activation by oxidative stress. *The Journal of Biological Chemistry*. (2009), 284, 13291-13295.
- Nigon, V.; Felix, M.A. History of research on *C. elegans* and other free-living nematodes as model organisms. En *WormBook, the online review of C. elegans biology*. The *C. elegans* Research Community (Ed.). (2017), 1-84.
- Nimptsch, K.; Zhang, X.; Cassidy, A.; Song, M.; O'Reilly, E.J.; Lin, J.H.; Pischon, T.; Rimm, E.B.; Willett, W.C.; Fuchs, C.S.; Ogino, S.; Chan, A.T.; Giovannucci, E.L.; Wu, K. Habitual intake of flavonoid subclasses and risk of colorectal cancer in 2 large prospective cohorts. *Am. J. Clin. Nutr.* (2016), 103, 184-191.
- Oikonomou, G.; Shaham, S. The glia of *Caenorhabditis elegans*. *Glia*. (2011), 59, 1253-1263.

- Okubo, T.; Ishihara, N.; Oura, A.; Serit, M.; Kim, M.; Yamamoto, T.; Mitsuoka, T. *In vivo* effect of tea polyphenol intake on human intestinal microflora and metabolism. *Biosci Biotechnol Biochem.* (1992), 56, 588–591.
- Olthoff, M.R.; Hollman, P.C.H.; Buijsman, M.N.C.P.; Van Amelsvoort, J.M.M.; Katan, M.B. Chlorogenic acid, quercetin-3-rutinoside and black tea phenol are extensively metabolized in humans. *J. Nutr.* (2003), 33, 1806–14.
- O'Reilly, L.P.; Luke, C.J.; Perlmutter, D.H.; Silverman, G.A.; Pak, S.C. *C. elegans* in high-throughput drug discovery. *Adv. Drug Deliv.* (2014), 69-70, 247-253.
- Organización Mundial de la Salud. Diet Nutrition and the Prevention of Chronic Diseases, Report of a Joint WHO/FAO Expert Consultation, WHO Technical Report Series 916. World Health Organization: Geneva, Switzerland, 2003.
- Ovaskainen, M.L.; Törrönen, R.; Koponen, J. M.; Sinkko, H.; Hellström, J.; Reinivuo, H.; Mattila, P. Dietary intake and major food sources of polyphenols in Finnish adults. *Journal of Nutrition.* (2008), 138, 562–566.
- Panchatcharam, M.; Miriyala, S.; Gayathri, V.S.; Suguna, L. Curcumin improves wound healing by modulating collagen and decreasing reactive oxygen species. *Molecular and Cellular Biochemistry.* (2006), 290, 87-96.
- Parkinson, L.; Cicerale, S. The Health Benefiting Mechanisms of Virgin Olive Oil Phenolic Compounds. *Molecules.* (2016), 21, 1734, 1-12.
- Parsell, D.A.; Taulien, J.; Lindquist, S. The role of heat-shock proteins in thermotolerance. *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B.* (1993), 339, 279–285.
- Pavelescu, L.A. On reactive oxygen species measurement in living systems. *Journal of Medicine and Life.* (2015), 8, 38-42.
- Pechan, P.M. Heat shock proteins and cell proliferation. *FEBS Lett.* (1991), 280, 1-4.
- Peirotén, A.; Gaya, P.; Alvarez, I.; Bravo, D.; Landete, J.M. Influence of different lignan compounds on enterolignan production by *Bifidobacterium* and *Lactibacillus* strains. *Int. J. Food Microbiol.* (2019), 289, 17-23.
- Peixoto, H.; Roxo, M.; Krstin, S.; Röhrig, T.; Richling, E.; Wink, M. An anthocyanin-rich extract of Acai (*Euterpe precatoria* Mart.) increases stress resistance and retards aging-related markers in *Caenorhabditis elegans*. *J. Agr. Food Chem.* (2016), 64, 1283-1290.

- Pereira-Caro, G.; Moreno-Rojas, J.; Brindin, N.; Del Rio, D.; Lean, M.E.J.; Hara, Y.; Crozier, A. Bioavailability of black tea thea flavins: absorption, metabolism and colonic catabolism. *J. Agric. Food Chem.* (2017), 65, 5365–5374.
- Pérez-Jiménez, J.; Fezeu, L.; Touvier, M.; Arnault, N.; Manach, C.; Hercberg, S.; Galan, P.; Scabert, A. Dietary intake of 337 polyphenols in French adults. *The American Journal of Clinical Nutrition.* (2011), 93, 1220–1228.
- Perron, N.R.; Brumaghim, J.L. A review of the antioxidant mechanisms of polyphenol compounds related to iron binding. *Cell Biochemistry and Biophysics.* (2009), 53, 75–100.
- Pervin, M.; Unno, K.; Ohishi, T.; Tanabe, H.; Miyoshi, N.; Nakamura, Y. Beneficial Effects of Green Tea Catechins on Neurodegenerative Diseases. *Molecules.* (2018), 23, 1297.
- Petrick, J.L.; Steck, S.E.; Bradshaw, P.T.; Trivers, K.F.; Abrahamson, P.E.; Engel, L.S.; He, K.; Chow, W.H.; Mayne, S.T.; Risch, H.A.; Vaughan, T.L.; Gammon, M.D. Dietary intake of flavonoids and oesophageal and gastric cancer: Incidence and survival in the United States of America (USA). *Br. J. Cancer.* (2015), 112, 1291-1300.
- Pietsch, K.; Saul, N.; Chakrabarti, S.; Stürzenbaum, S.R.; Menzel, R.; Steinberg, C.E. Hormetins, antioxidants and prooxidants: defining quercetin-, caffeic acid- and rosmarinic acid-mediated life extension in *C. elegans*. *Biogerontology.* (2011), 12, 329-347.
- Pietsch, K.; Saul, N.; Menzel, R.; Stürzenbaum, S.R.; Steinberg, C.E. Quercetin mediated lifespan extension in *Caenorhabditis elegans* is modulated by age-1, daf-2, sek-1 and unc-43. *Biogerontology.* (2009), 10, 565-578.
- Pietta, P.G. Flavonoids as antioxidants. *Journal of Natural Products.* (2000), 63, 1035-42.
- Pimpão, R. C.; Ventura, M. R.; Ferreira, R. B.; Williamson, G.; Santos, C. N. Phenolic sulfates as new and highly abundant metabolites in human plasma after ingestion of a mixed berry fruit purée. *British Journal of Nutrition.* (2015), 113, 454-463.
- Pimpão, R.C.; Dew, T.; Figueira, M.E.; McDougall, G.J.; Stewart, D.; Ferreira, R.B.; Santos, C.N.; Williamson, G. Urinary metabolite profiling identifies novel colonic metabolites and conjugates of phenolics in healthy volunteers. *Molecular Nutrition & Food Research.* (2014), 58, 1414-1425.

- Pinto, P.; Santos, C. N. Worldwide (poly)phenol intake: assessment methods and identified gaps. *European Journal of Nutrition*. (2017), 56, 1393-1408.
- Poquet, L.; Clifford, M.N.; Williamson, G. Effect of dihydrocaffeic acid on UV irradiation of human keratinocyte HaCaT cells. *Arch Biochem Biophys*. (2008), 476, 196–204.
- Potì, F.; Santi, D.; Spaggiari, G.; Zimetti, F.; Zanotti, I. Polyphenol Health Effects on Cardiovascular and Neurodegenerative Disorders: A Review and Meta-Analysis. *Int. J. Mol. Sci.* (2019), 20, 351.
- Pozuelo, M.J.; Agis-Torres, A.; Hervert-Hernández, D.; López-Oliva, M.E.; Muñoz-Martínez, E.; Rotger, R.; Groñil, I. Grape antioxidant dietary fiber stimulates lactobacillus growth in rat cecum. *Journal of Food Science*. (2012), 77, 59-62.
- Procházková, D.; Boušová, I.; Wilhelmová, N. Antioxidant and prooxidant properties of flavonoids. *Fitoterapia*. (2011), 82, 513–523.
- Puupponen-Pimiä, R.; Nohynek, L.; Hartmann-Schmidlin, S.; Kähkönen, M.; Heinonen, M.; Määttä-Riihinen, K.; Oksman-Caldentey, K.M. Berry phenolics selectively inhibit the growth of intestinal pathogens. *J. Appl. Microbiol.* (2005), 98, 991–1000.
- Qabazard, B.; Li, L.; Gruber, J.; Peh, M.T.; Ng, L.F.; Kumar, S.D.; Rose, P.; Tan, C.-H.; Dymock, B.W.; Wei, F.; Swain, S.C.; Halliwell, B.; Sturzenbaum, S.R.; Moore, P.K. Hydrogen Sulfide Is an Endogenous Regulator of Aging in *Caenorhabditis Elegans*. *Antioxid. Redox Signal*. (2014), 20, 2621-2630.
- Radd-Vagenas, S.; Duffy, S.L.; Naismith, S.L.; Brew, B.J.; Flood, V.M.; Fiatarone Singh, M.A. Effect of the Mediterranean diet on cognition and brain morphology and function: A systematic review of randomized controlled trials. *Am. J. Clin. Nutr.* (2018), 107, 389-404.
- Rechner, A.R.; Kuhnle, G.; Hu, H.L.; Roedig-Penman, A.; Van den Braak, M.H.; Moore, K.P.; Rice-Evans, C.A. The metabolism of dietary polyphenols and the relevance to circulating levels of conjugated metabolites. *Free Radical Research*. (2002), 36, 1229-1241.
- Renouf, M.; Guy, P.; Marmet, C.; Longet, K.; Fraering, A.L.; Moulin, J. Plasma appearance and correlation between coffee and green tea metabolites in human subjects. *Br J Nutr.* (2010), 104, 1635–1640.

- Requena, T.; Monagas, M.; Pozo-Bayón, M.A.; Martín-Álvarez, P.J.; Bartolomé, B.; del Campo, R.; Ávila, M.; Martínez-Cuesta, M.C.; Peláez, C.; Moreno-Arribas, M.V. Perspectives of the potential implications of wine polyphenols on human oral and gut microbiota. *Trends in Food Science & Technology*. (2010), 21, 332-344.
- Rice-Evans, C.A.; Miller, N.J.; Paganga, G. Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Radical Biology & Medicine*. (1996), 20, 933-56.
- Riddle, D.L.; Blumenthal, T.; Meyer, B.J.; Priess, J.R. *C. elegans* II. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor. (1997).
- Rios, L.Y.; Gonthier, M.P.; Remesy, C.; Mila, I.; Lapierre, C.; Lazarus, S.A.; Williamson, G.; Scalbert, A. Chocolate intake increases urinary excretion of polyphenol-derived phenolic acids in healthy human subjects. *Am J Clin Nutr*. (2003), 77, 912–918.
- Romero, C.; Brenes, M. Analysis of total contents of hydroxytyrosol and tyrosol in olive oils. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. (2012), 60, 9017-22.
- Romo-Vaquero, M.; García-Villalba, R.; González-Sarriás, A.; Beltrán, D.; Tomás-Barberán, F.A.; Espín, J.C. Interindividual variability in the human metabolism of ellagic acid: contribution of Gordonibacter to urolithin production. *Journal of Functional Foods*. (2015), 17, 785–791.
- Roosbeh, N.; Kashef, R.; Ghazanfarpour, M.; Kargarfard, L.; Darvish, L.; Khadivzadeh, T.; Dizavandi, F.R.; Afiat, M. Overview of the Effect of Herbal Medicines and Isoflavones on the Treatment of Cognitive Function. *J. Menopausal Med*. (2018), 24, 113.
- Rusznayk, S.; Szent-Gyorgyi, A. Vitamin P: Flavonols as vitamins. *Nature*. (1936), 138, 27.
- Saibabu, V.; Fatima, Z.; Khan, L.A.; Hameed, S. Therapeutic Potential of Dietary Phenolic Acids. *Advances in Pharmacological Sciences*. (2015), 823539, 1-10.
- Santhakumar, A.B.; Battino, M.; Alvarez-Suarez, J.M. Dietary polyphenols: structures, bioavailability and protective effects against atherosclerosis. *Food Chem Toxicol*. (2018), 113, 49–65.
- Santos-Buelga, C.; González-Paramás, A.M. Flavonoids: functions, metabolism and biotechnology. En *Industrial Biotechnology of Vitamins, Pigments, and Antioxidants*.

- Edited by Vandamme, E.J.; Revuelta, J.L. (Eds.). John Wiley & Sons: Weinheim, Germany. (2016), 469-496.
- Santos-Buelga, C.; González-Paramás, A.M. Strategies in the analysis of flavonoids. En *Handbook of chemical and biological plant analytical methods*. Hostettmann, K.; Stuppner, H.; Marston, A.; Chen, S. (Eds.). Switzerland: John Wiley & Sons. (2014), 543-569.
- Santos-Buelga, C.; Scalbert, A. Proanthocyanidins and tannin-like compounds: nature, occurrence, dietary intake and effects on nutrition and health. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. (2000), 80, 1094-1117.
- Sasot, G.; Martínez-Huélamo, M.; Vallverdú-Queralt, A.; Mercader-Martí, M.; Estruch, R.; Lamuela-Raventós, R. M. Identification of phenolic metabolites in human urine after the intake of a functional food made from grape extract by a high resolution LTQ-Orbitrap-MS approach. *Food Research International*. (2017), 100, 435-444.
- Saul, N.; Pietsch, K.; Menzel, R.; Steinberg, C.E. Quercetin- mediated longevity in *C. elegans*: Is DAF-16 involved? *Mechanisms of Ageing and Development*. (2008), 129, 10, 611-613.
- Saul, N.; Pietsch, K.; Menzel, R.; Stürzenbaum, S.R.; Steinberg, C.E.W. Catechin induced longevity in *C. elegans*: from Key regulator genes to disposable soma. *Mechanisms of Ageing and Development*. (2009), 130, 447-486.
- Saul, N.; Pietsch, K.; Stürzenbaum, S.R.; Menzel, R.; Steinberg, C.E. Diversity of polyphenol action in *Caenorhabditis elegans*: between toxicity and longevity. *J. Nat. Prod.* (2011), 74, 1713–1720.
- Schlesinger, M.J. Heat shock proteins. *J. Biol. Chem.* (1990), 265,12111–12114.
- Schön, C.; Wacker, R.; Micka, A.; Steudle, J.; Lang, S.; Bonnländer, B. Bioavailability Study of Maqui Berry Extract in Healthy Subjects. *Nutrients*. (2018), 10, 1720.
- Seo, K.; Choi, E.; Lee, D.; Jeong, D.E.; Jang, S.K.; Lee, S.J. Heat shock factor 1 mediates the longevity conferred by inhibition of TOR and insulin/IGF-1 signaling pathways in *C. elegans*. *Aging Cell*. (2013), 12, 1073–1081.
- Serafini, M.; Ghiselli, A.; Ferroluzzi, A. Red wine, tea, and antioxidants. *Lancet*. (1994), 344, 626.

- Serra, A.; Macià, A.; Romero M.A.; Reguant, J.; Ortega, N.; Motilva, M.J. Metabolic pathways of the colonic metabolism of flavonoids (flavonols, flavones and flavanones) and phenolic acids. *Food Chemistry*. (2012), 130, 383-393.
- Shen, J.; Wang, G.; Zuo, J. Caffeic acid inhibits HCV replication via induction of IFNalpha antiviral response through p62-mediated Keap1/Nrf2 signaling pathway. *Antivir. Res.* (2018), 154, 166-173.
- Shen, P.; Yue, Y.; Zheng, J.; Park, Y. *Caenorhabditis elegans*: A convenient *in vivo* model for assessing the impact of food bioactive components on obesity, aging, and alzheimer's disease. *Annual Review of Food Science and Technology*. (2018), 9, 1-22.
- Shi, G.F.; An, L.J.; Jiang, B.; Guan, S.; Bao, Y.M. Alpinia protocatechuic acid protects against oxidative damage *in vitro* and reduces oxidative stress *in vivo*. *Neurosci. Lett.* (2006), 403, 206-210.
- Shih, P.H.; Yeh, C.T.; Yen, G.C. Anthocyanins induce the activation of phase II enzymes through the antioxidant response element pathway against oxidative stress-induced apoptosis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. (2007), 55, 9427-35.
- Shrime, M.G.; Bauer, S.R.; McDonald, A.C.; Chowdhury, N.H.; Coltart, C.E.; Ding, E.L. Flavonoid-rich cocoa consumption affects multiple cardiovascular risk factors in a metaanalysis of short-term studies. *The Journal of Nutrition*. (2011), 141, 1982-1988.
- Sies, H. Oxidative stress: introductory remarks. In *Oxidative Stress*. Sies H. (Ed.). Academic Press: London. (1985), 1-8.
- Silva, F.A.; Borges, F.; Guimaraes, C.; Lima, J.L.F.C.; Maros, C.; Reis, S. Phenolic acids and derivatives: studies on the relationship among structure, radical scavenging activity, and physicochemical parameters. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. (2000), 48, 2122-2126.
- Silva, T.; Oliveira, C.; Borges, F. Caffeic acid derivatives, analogs and applications: a patent review (2009-2013). *Expert Opin Ther Pat.* (2014), 24, 1257-1270.
- Snutch, T.P.; Heschl, M.F.; Baillie, D.L. The *Caenorhabditis elegans* hsp70 gene family: a molecular genetic characterization. *Gene*. (1988), 64, 241-255.
- Sroka, Z.; Cisowski, W. Hydrogen peroxide scavenging, antioxidant and anti-radical activity of some phenolic acids. *Food Chem Toxicol.* (2003), 41, 753-758.

- Stalmach, A.; Mullen, W.; Barron, D.; Uchida, K.; Yokota, T.; Cavin, C.; Steiling, H.; Williamson, G.; Crozier, A. Metabolite profiling of hydroxycinnamate derivatives in plasma and urine after the ingestion of coffee by humans: identification of biomarkers of coffee consumption. *Drug Metab Dispos.* (2009), 37, 1749–1758.
- Steinkraus, K.A.; Smith, E.D.; Davis, C.; Carr, D.; Pendergrass, W.R.; Sutphin, G.L.; Kennedy, B.K.; Kaeberlein, M. Dietary restriction suppresses proteotoxicity and enhances longevity by an hsf-1-dependent mechanism in *Caenorhabditis elegans*. *Aging Cell.* (2008), 7, 394-404.
- Stevens, J.F.; Maie, C.S. The chemistry of gut microbial metabolism of polyphenols. *Phytochem. Rev.* (2016), 15, 425–444.
- Strayer, A.; Wu, Z.; Christen, Y.; Link, C.D.; Luo, Y. Expression of the small heat-shock protein Hsp16-2 in *Caenorhabditis elegans* is suppressed by Ginkgo biloba extract EGb 761. *FASEB J.* (2003), 17, 2305–2307.
- Sugahara, S.; Chiyo, A.; Fukuoka, K.; Ueda, Y.; Tokunaga, Y.; Nishida, Y.; Kinoshita, H.; Matsuda, Y.; Igoshi, K.; Ono, M.; Yasuda, S. Unique antioxidant effects of herbal leaf tea and stem tea from *Moringa oleifera* L. especially on superoxide anion radical generation systems. *Biosci Biotechnol Biochem.* (2018), 82, 1973-1984.
- Sulston, J.E.; Schierenberg, E.; White, J.G.; Thomson, J.N. The embryonic cell lineage of the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Developmental Biology.* (1983), 100, 64-119.
- Sunagawa, T.; Shimizu, T.; Kanda, T.; Tagashira, M.; Sami, M.; Shirasawa, T. Procyanidins from apples (*Malus pumila* Mill.) extend the lifespan of *Caenorhabditis elegans*. *Planta Med.* (2011), 77, 122-127.
- Surco-Laos, F.; Cabello, J.; Gómez-Orte, E.; González-Manzano, S.; González-Paramás, A.M.; Santos-Buelga, C.; Dueñas, M. Effects of O-methylated metabolites of quercetin on oxidative stress, thermotolerance, lifespan and bioavailability on *Caenorhabditis elegans*. *Food & Function.* (2011), 2, 445-56.
- Surco-Laos, F.; Duenas, M.; Gonzalez-Manzano, S.; Cabello, J.; Santos-Buelga, C.; González-Paramás, A.M. Influence of catechins and their methylated metabolites on lifespan and resistance to oxidative and thermal stress of *Caenorhabditis elegans* and epicatechin uptake. *Food Res Int.* (2012), 46, 514–521.



- Szwajgier, D.; Borowiec, K.; Pustelniak, K. The Neuroprotective Effects of Phenolic Acids: Molecular Mechanism of Action. *Nutrients*. (2017), 9, 477, 1-21.
- Tai, A.; Sawano, T.; Ito, H. Antioxidant properties of vanillic acid esters in multiple antioxidant assays. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* (2012), 76, 314–318.
- Tang, S.Y.; Halliwell, B. Medicinal plants and antioxidants: what do we learn from cell culture and *Caenorhabditis elegans* studies? *Biochemistry and Biophysical Research Communications*. (2010), 394, 1-5.
- Tang, Y.; Nakashima, S.; Saiki, S.; Myoi, Y.; Abe, N.; Kuwazuru, S.; Zhua, B.; Ashida, H.; Murata, Y.; Nakamura, Y. 3,4-Dihydroxyphenylacetic acid is a predominant biologically-active catabolite of quercetin glycosides. *Food Research International*. (2016), 89, 716–723.
- Tarozzi, A.; Morroni, F.; Hrelia, S.; Angeloni, C.; Marchesi, A.; Cantelli-Forti, G.; Hrelia, P. Neuroprotective effects of anthocyanins and their *in vivo* metabolites in SH-SY5Y cells. *Neurosci. Lett.* (2007), 424, 36-40.
- Tissenbaum, H. A.; Guarente, L. Increased dosage of a sir-2 gene extends lifespan in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*. (2001), 410, 227-230.
- Tomás-Barberán, F.A.; Selma, M.V.; Espín, J.C. Interactions of gut microbiota with dietary polyphenols and consequences to human health. *Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care*. (2016), 19, 471–476.
- Tomás-Barberán, F.A.; Selma, M.V.; Espin, J.C. Polyphenols' Gut Microbiota Metabolites: Bioactives or Biomarkers? *J. Agric. Food Chem.* (2018), 66, 3593–3594.
- Tullet, J.M.; Hertweck, M.; An, J.H.; Baker, J.; Hwang, J.Y.; Liu, S.; Oliveira, R.P.; Baumeister, R.; Blackwell, T.K. Direct inhibition of the longevity-promoting factor SKN-1 by insulin-like signaling in *C. elegans*. *Cell*. (2008), 132, 1025-38.
- Turrens, J.F. Superoxide production by the mitochondrial respiratory chain. *Bioscience Reports*. (1997), 17, 3–8.
- Urpi-Sarda, M.; Monagas, M.; Khan, N.; Lamuela-Raventos, R.M.; Santos-Buelga, C.; Sacanella, E.; Castell, M.; Permanyer, J.; Andres-Lacueva, C. Epicatechin, procyanidins, and phenolic microbial metabolites after cocoa intake in humans and rats. *Anal. Bioanal. Chem.* (2009), 394, 1545–1556.

- Valdés, L.; Cuervo, A.; Salazar, N.; Ruas-Madiedo, P.; Gueimonde, M.; González, S. The relationship between phenolic compounds from diet and microbiota: impact on human health. *Food & Function*. (2015), 6, 2424-2439.
- Van der Horst, A.; Tertoolen, L.G.; de Vries-Smits, L.M.; Frye, R.A.; Medema, R.H.; Burgering, B.M. FOXO4 is acetylated upon peroxide stress and deacetylated by the longevity protein hSir2(SIRT1). *J. Biol. Chem.* (2004), 279, 28873-28879.
- Vari, R.; D'Archivio, M.; Filesi, C.; Carotenuto, S.; Scazzocchio, B.; Santangelo, C.; Giovannini, C.; Masella, R. Protocatechuic acid induces antioxidant/detoxifying enzyme expression through JNK-mediated Nrf2 activation in murine macrophages. *J. Nutr. Biochem.* (2011), 22, 409-17.
- Viswanathan, M.; Tissenbaum, H.A. *C. elegans* sirtuins. *Methods Mol Biol.* (2013), 1077, 39-56.
- Vitaglione, P.; Donnarumma, G.; Napolitano, A.; Galvano, F.; Gallo, A.; Scalfi, L.; Fogliano, V. Protocatechuic acid is the major human metabolite of cyanidin-glucosides. *J Nutr.* (2007), 137, 2043–2048.
- Vogiatzoglou, A.; Mulligan, A.A.; Lentjes, M.A.; Luben, R.N.; Spencer, J.P.; Schroeter, H.; Khaw, K.T.; Kuhnle, G.G. Flavonoid intake in European adults (18 to 64 years). *PLoS One.* (2015), 26, 10, e0128132.
- Wang, D.; Wei, X.; Yan, X; Jin, T.; Ling, W. Protocatechuic acid, a metabolite of anthocyanins, inhibits monocyte adhesion and reduces atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice. *J Agric Food Chem.* (2010), 58, 12722–12728.
- Wang, H.; Joseph, J.A. Quantifying cellular oxidative stress by dichlorofluorescein assay using microplate reader. *Free Radical Biology and Medicine.* (1999), 27, 612-616.
- Wang, S.; Moustaid-Moussa, N.; Chen, L.; Mo, H.; Shastri, A.; Su, R. Novel insights of dietary polyphenols and obesity. *J Nutr Biochem.* (2014), 25, 1-18.
- Wang, S.; Sarriá, B.; Mateos, R.; Goya, L.; Bravo-Clemente, L. TNF- $\alpha$ -induced oxidative stress and endothelial dysfunction in EA.hy926 cells is prevented by mate and green coffee extracts, 5-caffeoylquinic acid and its microbial metabolite, dihydrocaffeic acid. *International Journal of Food Sciences and Nutrition.* (2019), 70, 267-284.

- Wang, Y.; Stevens, V.L.; Shah, R.; Peterson, J.J.; Dwyer, J.T.; Gapstur, S.M.; McCullough, M.L. Dietary flavonoid and proanthocyanidin intakes and prostate cancer risk in a prospective cohort of US men. *Am. J. Epidemiol.* (2014), 179, 974-986.
- Warner, E.F.; Smith, M.J.; Zhang, Q.; Raheem, K.S.; O'Hagan, D.; O'Connell, M.A.; Kay, C.D. Signatures of anthocyanin metabolites identified in humans inhibit biomarkers of vascular inflammation in human endothelial cells. *Molecular Nutrition and Food Research.* (2017), 61, 1-10.
- Wei, C.; Hongru, L.; Congmin, W.; Xiaohua, L.; Menglu, S.; Zhenzhou, Y.; Xinyan, C.; Hongbing, W. Echinacoside, a phenylethanoid glycoside from *Cistanche deserticola*, extends lifespan of *Caenorhabditis elegans* and protects from A $\beta$ -induced toxicity. *Biogerontology.* (2017), 19, 47-65.
- Williamson, G. The role of polyphenols in modern nutrition. *Nutrition Bulletin.* (2017), 42, 226-235.
- Williamson, G.; Clifford, M.N. Colonic metabolites of berry polyphenols: the missing link to biological activity? *The British Journal of Nutrition.* (2010), 104, S48-S66.
- Williamson, G.; Clifford, M.N. Role of the small intestine, colon and microbiota in determining the metabolic fate of polyphenols. *Biochemical Pharmacology.* (2017), 139, 24–39.
- Williamson, G.; Holst, B. Dietary reference intake (DRI) value for dietary polyphenols: are we heading in the right direction? *British Journal of Nutrition.* (2008), 99, 55–58.
- Wilson, M.A.; Shukitt-Hale, B.; Kalt, W.; Ingram, D.K.; Joseph, J.A.; Wolkow, C.A. Blueberry polyphenols increase lifespan and thermotolerance in *Caenorhabditis elegans*. *Aging Cell.* (2006), 5, 59-68.
- Woo, H.D.; Lee, J.; Choi, I.J.; Kim, C.G.; Lee, J.Y.; Kwon, O.; Kim, J. Dietary flavonoids and gastric cancer risk in a Korean population. *Nutrients.* (2014), 6, 4961-4973.
- Wood, W.B. The nematode *Caenorhabditis elegans*. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press (1988).
- Wu, Z.; Smith, J.V.; Paramasivam, V.; Butko, P.; Khan, I.; Cypser, J.R.; Luo, Y. Ginkgo biloba extract EGb 761 increases stress resistance and extends life span of *Caenorhabditis elegans*. *Cell and Molecular Biology.* (2002), 48, 725-731.

- Xiong, L.G.; Chen, Y.J.; Tong, J.W.; Gong, Y.S.; Huang, J.A.; Liu, Z.H. Epigallocatechin-3-gallate promotes healthy lifespan through mitohormesis during early-to-mid adulthood in *Caenorhabditis elegans*. *Redox Biology*. (2018), 14, 305-315.
- Xiong, L.G.; Huang, J.A.; Li, J.; Yu, P.H.; Xiong, Z.; Zhang, J.W.; Gong, Y.S.; Liu, Z.H.; Chen, J.H. Black tea increased survival of *Caenorhabditis elegans* under stress. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. (2014), 62, 11163-11169.
- Yang, G.; Wang, Y.; Sun, J.; Zhang, K.; Liu, J. Ginkgo Biloba for Mild Cognitive Impairment and Alzheimer's Disease: A Systematic Review and Meta-Analysis of Randomized Controlled Trials. *Curr. Top. Med. Chem.* (2016), 16, 520-528.
- Yang, Y.C.; Lu, F.H.; Wu, J.S.; Wu, C.H.; Chang, C.J. The protective effect of habitual tea consumption on hypertension. *Archives Internal Medicine*. (2004), 164, 1534-1540.
- Yip, E.C.; Chan, A.S.; Pang, H.; Tam, Y.K.; Wong, Y.H. Protocatechuic acid induces cell death in HepG2 hepatocellular carcinoma cells through a c-Jun N-terminal kinase-dependent mechanism. *Cell Biol Toxicol*. (2006), 22, 293–302.
- Zamora-Ros, R.; Knaze, V.; Rothwell, J.A., Hémon, B.; Moskal, A.; Overvad, K.; Tjønneland, A.; Kyro, C.; Fagherazzi, G.; Boutron-Ruault, M.C.; Touillaud, M.; Katzke, V.; Kuhn, T.; Boeing, H.; Forster, J.; Trichopoulou, A.; Valanou, E.; Peppas, E.; Palli, D.; Agnoli, C.; Ricceri, F.; Tumino, R.; de Magistris, M.S.; Peeters, P.H.M.; Bueno-de-Mesquita, H.B.; Engeset, D.; Skeie, G.; Hjartaker, A.; Menendez, V.; Agudo, A.; Molina-Montes, E.; Huerta, J.M.; Barricarte, A.; Amiano, P.; Sonestedt, E.; Nilsson, L.M.; Landberg, R.; Key, T.J.; Khaw, K.T.; Wareham, N.J.; Lu, Y.X.; Slimani, N.; Romieu, I.; Riboli, E.; Scalbert, A. Dietary polyphenol intake in Europe: the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC) study. *European Journal of Nutrition*. (2016), 55, 1359-1375.
- Zamora-Ros, R.; Not, C.; Guino, E.; Lujan-Barroso, L.; Garcia, R.M.; Biondo, S.; Salazar, R.; Moreno, V. Association between habitual dietary flavonoid and lignan intake and colorectal cancer in a Spanish case-control study (the Bellvitge Colorectal Cancer Study). *Cancer Causes Control*. (2013), 24, 549-557.
- Zarkower, D. Somatic sex determination. En *WormBook, the online review of C. elegans biology*. The *C. elegans* Research Community (Ed.). (2006), 1-12.

- Zevian, S.C.; Yanowitz, J. Heat shock of the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Methods*. (2014), 68, 450-457.
- Zhang, H.; Liu, Q.; Lin, J.; Wang, Y.; Chen, S.; Hou, J. GW27-e0657 resveratrol protects against oxidized LDL-induced foam cells formation and apoptosis through inhibition of ER stress and downregulation of CD36. *J Am Coll Cardiol*. (2016), 16, C26.
- Zhang, J.; Lu, L.; Zhou, L. Oleanolic acid activates daf-16 to increase lifespan in *Caenorhabditis elegans*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. (2015), 25, 843-849.
- Zhang, L.; Jie, G.; Zhang, J.; Zhao, B. Significant longevity extending effects of EGCG on *Caenorhabditis elegans* under stress. *Free Radicals Biol. Med.* (2009), 46, 414–421.
- Zhang, Q.; Raheem, K.S.; Botting, N.P.; Slawin, A.M. Z.; Kay, C.D.; O'Hagan, D. Flavonoid metabolism: the synthesis of phenolic glucuronides and sulfates as candidate metabolites for bioactivity studies of dietary flavonoids. *Tetrahedron*. (2012), 68, 4194-4201.
- Zhang, X.; Shi, GF.; Liu, X.Z.; An, L. J.; Guan, S. Anti-ageing effects of protocatechuic acid from *Alpinia* on spleen and liver antioxidative system of senescent mice. *Cell. Biochem. Funct.* (2011), 29, 342-347.
- Zhang, Y.; Dai, M.; Yuan, Z. Methods for the detection of reactive oxygen species. *Anal. Methods*. (2018), 10, 4625.
- Zhang, Y.Y.; Li, X.L.; Li, T.Y.; Li, M.Y.; Huang, R.M.; Li, W.; Yang, R.L. 3-(4-Hydroxyphenyl) propionic acid, a major microbial metabolite of procyanidin A2, shows similar suppression of macrophage foam cell formation as its parent molecule. *RSC Adv.* (2018), 8, 6242–6250.
- Zheng, S.Q.; Huang, X.B.; Xing, T.K.; Ding, A.J.; Wu, G.S.; Luo, H.R. Chlorogenic acid extends the lifespan of *Caenorhabditis elegans* via Insulin/IGF-1 signaling pathway. *The Journals of Gerontology Series A: Biological Sciences and Medical Sciences*. (2017), 72, 464-472.
- Zhou, Y.; Zheng, J.; Li, Y.; Xu, D.P.; Li, S.; Chen, Y.M.; Li, H.B. Natural polyphenols for prevention and treatment of cancer. *Nutrients*. (2016), 8, 515.



## *VII. ANEXO*





Article

# Preparation and Characterization of Protocatechuic Acid Sulfates

Sofia M. Gutierrez-Zetina, Susana Gonzalez-Manzano, Jose J. Perez-Alonso, Ana M. Gonzalez-Paramas  and Celestino Santos-Buelga \* 

Grupo de Investigación en Polifenoles, Unidad de Nutrición y Bromatología, Facultad de Farmacia, Universidad de Salamanca, Campus Miguel de Unamuno, 37007 Salamanca, Spain; sofia\_martinez@usal.es (S.M.G.-Z.); susanagm@usal.es (S.G.-M.); josejpa@usal.es (J.J.P.-A.); paramas@usal.es (A.M.G.-P.)

\* Correspondence: csb@usal.es; Tel.: +34-9-23-29-45-37

Academic Editors: Federica Pellati, Laura Mercolini and Roccaldo Sardella

Received: 21 December 2018; Accepted: 13 January 2019; Published: 16 January 2019



**Abstract:** Protocatechuic acid (3,4-dihydroxybenzoic acid; PCA) is a phenolic acid present in plants as a secondary metabolite and is also produced in the human organism as a metabolite from the degradation of polyphenols by the intestinal microbiota, particularly of flavonoids. However, PCA, like most polyphenols, is biotransformed in the human body to different conjugates as sulfates, which are found circulating in blood and could be involved in the bioactivity of the original compound. This paper describes a simple process for the preparation of PCA monosulfates with satisfactory yields. Two compounds were obtained that were identified as PCA-3-sulfate and PCA-4-sulfate by mass spectrometry and  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  nuclear magnetic resonance using one- and two-dimensional techniques (heteronuclear single-quantum coherence and heteronuclear multiple-bond correlation). Differential MS fragmentation behavior and UV spectra were observed for each compound, which could be used for their identification in samples of unknown composition. The described procedure can be used for the preparation of these polyphenol metabolites in view of their use in *in vivo* and *in vitro* studies, as well as standards for their analysis in biological fluids, to contribute to the elucidation of biological effects of dietary polyphenols.

**Keywords:** polyphenols; phenolic metabolites; phase II conjugates; phenolic acids; sulfates; hemisynthesis; identification

## 1. Introduction

Most polyphenols are poorly absorbed and largely biotransformed in the human body, either by phase I and II enzymes of the metabolism or by gut microbiota, so that metabolites represent the main circulating forms of dietary polyphenols in the organism and may ultimately be responsible for the reported bioactivity of the original compounds [1]. Most of the consumed polyphenols usually reach the gut, where they interact with the microbiota and can be degraded to a range of products that may be bioactive [2–4]. As a matter of fact, the concentrations in plasma and urine of microbial phenolic metabolites are normally higher than those of the metabolites derived from polyphenols uptake in the stomach or small intestine [5–9]. In general, phenolic sulfates have been indicated as abundant metabolites of polyphenols in human plasma [10].

Protocatechuic acid (3,4-dihydroxybenzoic acid; PCA) is a phenolic acid present in plants as a secondary metabolite produced through the shikimic acid pathway [11]. As such, it is commonly found in fruits, vegetables, grains and spices, such as grapes, berries, onions, brown rice, rosemary, and cinnamon, among others [12]. PCA is also produced in the human organism as a metabolite from the degradation of polyphenols by the intestinal microbiota, particularly of flavonoids like anthocyanins, flavonols or procyanidins [13]. It may be absorbed through the intestinal epithelium and

reach systemic circulation. After uptake, PCA undergoes structural modifications through conjugation processes, mostly occurring in the liver, giving rise to sulfated and glucuronidated forms that can be distributed to the tissues, recycled back to the intestine, or excreted in urine [14,15]. PCA conjugates have been detected in relevant concentrations in plasma, urine, and feces after consumption of polyphenol-rich diets [7–10,16]. Concentrations of phase II conjugates (sulfates + glucuronides) of PCA up to  $5,540 \pm 490$  nM were determined in urine by Czank et al. [7] following consumption of 500 mg of  $^{13}\text{C}$ -labelled cyanidin-3,*O*-glucoside by healthy humans, reaching maximum level 24 h after intake. In the same intervention study, maximum concentrations of PCA sulfates of  $157 \pm 116$  nM were found in serum with a  $t_{\text{max}}$  of  $11.4 \pm 3.8$  h, while maximum urinary concentrations of  $1112 \pm 318$  nM and  $1244 \pm 333$  nM were found for PCA-3-sulfate and PCA-4-sulfate, respectively, 1–2 h after anthocyanin intake [9]. Both sulfates were also detected in feces with maximum recoveries of  $30.0 \pm 27.7$   $\mu\text{g}$  (PCA-3-sulfate) and  $23.0 \pm 18.1$   $\mu\text{g}$  (PCA-4-sulfate) at 6–24 h post-bolus from 500 mg of anthocyanidin consumption [9]. De Ferrars et al. [8] found that PCA sulfates constituted the main group of phenolic metabolites in plasma, representing 28.31% of total detected metabolites 3 h after an acute intake of 500 mg of an elderberry extract by post-menopausal women. Concentrations of PCA sulfates determined at 3 h after intake were  $2014 \pm 1765$  nM/mM creatinine and 358 nM in urine and plasma, respectively, higher than those of PCA glucuronides ( $495 \pm 190$  nM/mM creatinine and 29 nM) and non-conjugated PCA ( $1534 \pm 1232$  nM/mM creatinine and 24 nM) [8].

Different biological and pharmacological activities have been ascribed to PCA, including antioxidant, antimicrobial, anticancer, antiulcer, antidiabetic, antiaging, anti-inflammatory, and analgesic properties, as well as cardiovascular, hepatic, neurological, and nephron protective effects [11,12]. As for PCA sulfates, some authors have reported anti-inflammatory effects in *in vitro* assays. Thus, PCA sulfates have been shown to reduce the production of proinflammatory biomarkers of coronary risk, such as interleukin-6 (IL-6) [17] and soluble vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1) in human endothelial cells [17,18]. In addition, PCA-3-sulfate was demonstrated to significantly reduce liposaccharide induced tumor necrosis factor alpha (LPS-TNF- $\alpha$ ) secretion and decrease interleukin-1 beta (IL-1 $\beta$ ) in THP-1 monocytes [19].

A common problem when studying the effects and activity of conjugated metabolites of phenolic compounds, such as PCA sulfates, is the usual lack of commercial standards, so they must be prepared in the laboratory. Procedures for the chemical hemisynthesis of sulfates of different hydroxybenzoates that are common metabolites of flavonoids, including protocatechuic acid, were previously described by Zhang et al. [20] and Almeida et al. [21]. The method by Zhang et al. [20] involved the selective protection of hydroxyl groups in the form of benzyl esters or *tert*-butyldimethylsilyl ethers and further sulfation with trichloroethyl (TCE) chlorosulfate; finally, the protecting groups (TCE, benzyl, silyl) were removed by hydrogenation under mild reducing conditions and in HF-pyridine in THF to yield the corresponding sulfate derivatives. Sulfate derivatives were synthesized by Almeida et al. [21] by reaction of phenolic precursors with sulfur trioxide-pyridine in anhydrous pyridine and further purified on a Dowex 50W-X8 ion-exchange resin. The products were then converted into their sodium salts to improve their stability.

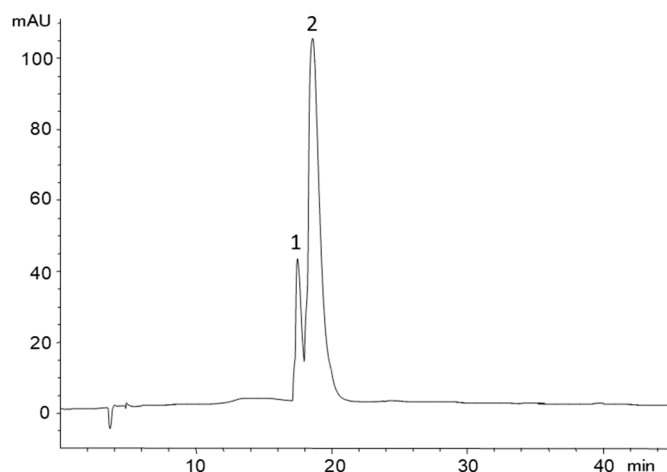
In the present study, another feasible and easily reproducible method using sulfur trioxide-*N*-triethylamine as sulfation reagent was proposed for the preparation of PCA sulfates. Furthermore, UV absorption and mass spectral characteristics, NMR data for their structural characterization, as well as information about their stability are provided. This knowledge is expected to contribute to the correct identification of these metabolites in biological samples. Furthermore, the proposed procedure can be used for the preparation of PCA sulfates in view of their employment in studies on their biological activity and mechanisms of action.

## 2. Results and Discussion

### 2.1. Preparation of PCA Sulfates

PCA sulfates were prepared via the reaction of the precursor phenolic acid with sulfur trioxide-*N*-triethylamine, based on a method previously described for the preparation of flavonoid sulfates [22]. The reaction was kept for 3 h, at which it was verified that the formation of the sulfates reached their maximum, as checked by HPLC. The obtained chromatograms showed a not-well resolved mixture of peaks presenting pseudomolecular ions  $[M - H]^-$  at  $m/z$  313 and 233, coherent with PCA disulfates and monosulfates, respectively, together with some remaining PCA ( $[M - H]^-$  at  $m/z$  153).

Semipreparative HPLC of this crude mixture allowed obtaining different fractions with a mixture of the two monosulfates in different proportions, but none of them contained a single compound. The close elution and difficult chromatographic separation of PCA-3-sulfate and PCA-4-sulfate have also been noticed by other authors [8,10,16,21]. Fractions containing the monosulfates were pooled to a unique fraction, which was concentrated and passed through an ion exchange cartridge, Oasis MCX, to remove residual trimethylamine; the sulfates were further converted into their sodium salts and freeze-dried. Finally, 128 mg of a clean fraction containing the two PCA monosulfates was obtained as sodium salts, which represented a final yield of 15.5%. Figure 1 shows the HPLC chromatogram of the obtained extract.



**Figure 1.** HPLC chromatogram recorded at 250 nM corresponding to the mixture of protocatechuic acid (PCA) monosulfates obtained after semipreparative HPLC fractionation. Peak identification: (1) PCA-4-sulfate, and (2) PCA-3-sulfate.

Compared to previously described procedures for the synthesis of benzoic acid sulfates [20,21], the method proposed herein is faster and simpler, and it only involves one reaction step. A different sulfation reagent (i.e., sulfur trioxide-*N*-triethylamine) is employed and the use of pyridine is avoided, making it safer and facilitating the removal of the solvent and reagent excess. In preliminary assays carried out to optimize the method, it was also checked that partial losses of the products were produced during the elimination of pyridine, when it was used as a solvent, as also reported by Almeida et al. [21].

### 2.2. Absorption and Mass Spectral Characteristics

ESI/MS analysis of peaks 1 and 2 confirmed that they had the same pseudomolecular ion  $[M - H]^-$  at  $m/z$  233, corresponding to PCA monosulfates, and also showed the same  $MS^2$  fragmentation pattern yielding product ions at  $m/z$  189, 153, and 109. The ion at  $m/z$  189 can be attributed to the loss of  $CO_2$  ( $[M - H - 44]^-$ ) from the carboxyl group of the PCA, indicating that this functional group was not

substituted and allowing the confirmation of the phenolic hydroxyl groups as location for the sulfate moieties. The fragment at  $m/z$  109 was due to the further loss of the sulfate group ( $[M - H - 44 - 80]^-$ ) (Figure 2). For both compounds, the main  $MS^2$  fragment was at  $m/z$  153 (PCA) from the loss of the sulfate group ( $[M - H - 80]^-$ ), but there were some differences in the relative abundance among the distribution of the other two fragment ions. For peak 1, the abundance of ion at  $m/z$  109 was 74%, and at  $m/z$  189 was 5%, while for peak 2 the abundance of ion at  $m/z$  109 was 78% and at  $m/z$  189 was 4%. Interestingly, the two peaks also possessed different UV spectra (Figure 3). Peak 1 presented two bands of maximum absorption at 242 nM and 294 nM, whereas peak 2 showed  $\lambda_{max}$  at 254 nM. The existence of different fragmentation behavior and spectral shapes are characteristic features that might allow the assignment of peak identities in a given sample with unknown composition.

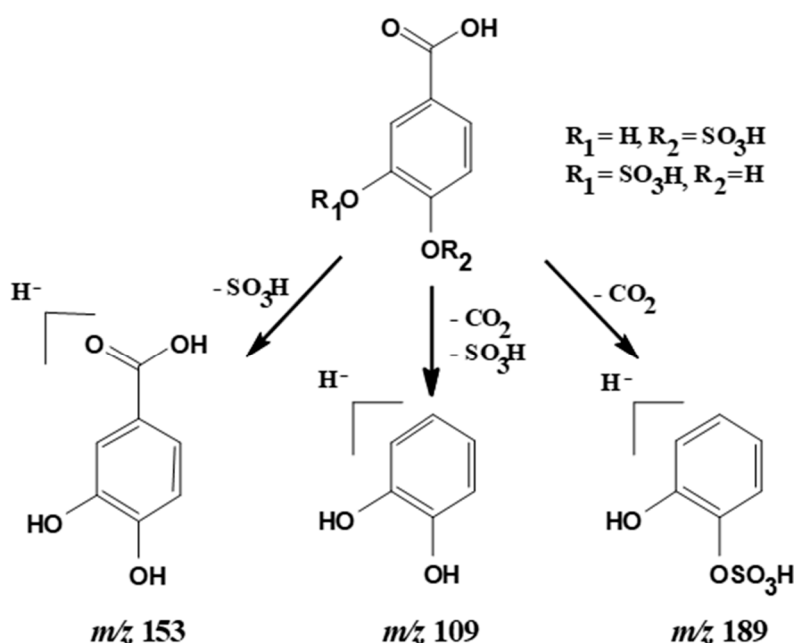


Figure 2.  $MS^2$  fragmentation of the PCA monosulfates (pseudomolecular ion  $[M - H]^-$  at  $m/z$  233).

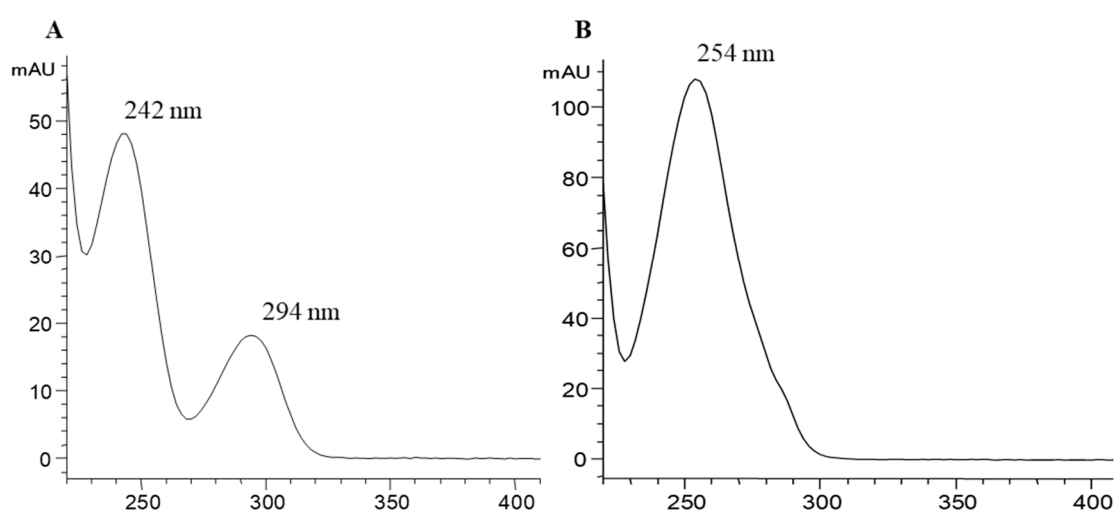


Figure 3. UV spectra of peaks 1 (A) and 2 (B) in the chromatogram of Figure 1.

### 2.3. NMR Analysis

The nMR spectrum of the PCA monosulfates mixture showed two series of analogous peaks, with two doublets and one singlet for each series. The COSY, HMQC and HMBC plots (see Figures S1–S3, included as supplementary information) did not show interactions between the two series of peaks, which confirmed the existence of two different compounds.  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$ -NMR data and assignments of the displacements of the protons and carbons in each position of the aromatic ring, made based on the two-dimensional spectra  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HMBC and HSQC, are shown in Table 1. The obtained results agreed with data predicted by the Perkin Elmer ChemDraw Professional 16.0.1.4 (77) software, with minor modifications in the displacement of the protons in position 2 for PCA-3-sulfate and in position 5 for PCA-4 sulfate. This difference was explained by the influence of the adjacent sulfate group, which has free rotation and can adopt a conformation in which the interaction is greater than theoretically expected. The major compound was assigned to PCA-3-sulfate, for which it was found that the proton in position 2 appeared at 7.76 ppm, undergoing a more significant shift to a lower field than would theoretically be expected (6.85 ppm), while the proton H5 did not change over the expected displacement. In the minority compound, PCA-4-sulfate, proton H5 underwent a lower field displacement (7.14 ppm) than theoretically expected (6.85 ppm), which could be explained by the interaction of the adjacent sulfate group. The two sulfates showed a proportion of 1:2.5, as determined by nMR. The identification of PCA-3-sulfate as the major compound allowed it to be assigned to the peak 2, which showed the largest area in the chromatogram of Figure 1; consequently, PCA-4-sulfate, the compound with lower nMR signal, was assigned to peak 1.

**Table 1.**  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$ -NMR data and HMBC correlations obtained for PCA-3-sulfate, and PCA-4 sulfate determined in deuterated DMSO.

Position.	$\delta$ $^1\text{H}$ (ppm); m; J (Hz)	$\delta$ $^{13}\text{C}$ (ppm)	HMBC
<b>PCA-3-Sulfate</b>			
1		125.2	H2, H5
2	7.76, s *	124.1	H6
3		140	H2, H5, H6
4		152.3	H2, H5, H6
5	6.80, d, J = 8.0	116.2	H6
6	7.50, d, J = 8.4	126.5	H2, H5
Carbonyl		169	H2, H6
<b>PCA-4-Sulfate</b>			
1		148.1	H2, H5
2	7.40, s	118.1	H6
3		148.1	H5, H2
4		143.2	H2, H6, H5
5	7.14, d, J = 9.2	121.4	
6	7.31, d, J = 9.8	120.7	H2
Carbonyl		169	H2, H6

s \*, singlet; d, doublet.

### 2.4. Stability of the Freeze-Dried Sulfates

The prepared compounds were freeze-dried and stored in a desiccator at room temperature for three months. On days 1, 15, 30, 60, and 90, 2 mg of the preparation was weighed and dissolved in ultrapure water to obtain a final concentration of 0.1 mg/mL and analyzed by HPLC to check stability. According to the peak areas recorded at 250 nM (Table 2), it can be considered that the freeze-dried compounds only kept reasonable stability for around 15 days (88% of the initial peak area for PCA-4-sulfate and 85% for PCA-3-sulfate) to then fell quickly, losing up to 98% of their initial concentration at day 30 of storage. This loss was mainly attributed to the cleavage of the sulfate moiety

to release PCA, as observed in the chromatograms. The stability of both compounds was very similar between them.

**Table 2.** Evolution of the areas (mAU) of the chromatographic peaks of PCA-4-sulfate and PCA-3-sulfate recorded at 250 nM over 3 months of storage of the freeze-dried compound at room temperature.

Time (days)	PCA-4-Sulfate (mAU)	PCA-3-Sulfate (mAU)
1	1203.6 (100% *)	5940.4 (100%)
15	1062.3 (88%)	5095.5 (85%)
30	23.4 (2%)	163.8 (2.7%)
60	18 (1.5%)	123.6 (2%)
90	0 (0%)	132.3 (2.2%)

\* in brackets it is indicated the percentage of peak area relative to day 1.

### 3. Materials and Methods

#### 3.1. Standards and Reagents

Protocatechuic acid (PCA), dioxane, trifluoroacetic acid (TFA), acetonitrile, and sulfur trioxide-*N*-triethylamine were purchased from Sigma-Aldrich (Darmstadt, Germany). Methanol was purchased from Macron Fine Chemicals<sup>TM</sup> (Gliwice, Poland), formic acid and ammonia from VWR (Fontenay-sous-Bois, France), and sodium hydroxide from Panreac (Barcelona, Spain).

#### 3.2. Preparation of PCA Sulfates

The procedure was based on the method previously described in our laboratory for the hemisynthesis of catechin sulfates [22] with modifications. PCA (500 mg) was dissolved in dioxane (50 mL) and allowed to react with a 10-fold molar excess of sulfur trioxide-*N*-triethylamine. The reaction was carried out under an argon atmosphere in a water bath (40 °C) for 3 h. The sulfation products precipitated out and the supernatant was decanted. The precipitate was re-dissolved in ultrapure water and dried on a rotary evaporator. The composition of the extract containing a sulfate mixture was analyzed by HPLC-DAD-MS, as described in Section 3.3. Products of sulfation were newly recovered in a minimal volume of ultrapure water, and PCA monosulfates were further fractionated by semi-preparative HPLC, as described below. The fractions containing the monosulfates were collected, concentrated, and re-dissolved in 2% formic acid in ultrapure water and loaded into an ion exchange cartridge, Oasis MCX 3 cc (60 mg), to remove residual trimethylamine. The cartridges were conditioned with methanol and equilibrated with ultrapure water; the sample was loaded and eluted with 2% formic acid in ultrapure water, and the sulfates were collected in this step. For greater stability, the sulfates were converted into their sodium salts as described by Almeida et al. [21], with 0.5 M sodium hydroxide, and freeze-dried. The identity and purity of the compounds were checked by NMR, as described below. The stability of the freeze-dried compounds was evaluated by HPLC from the areas of their chromatographic peaks recorded at 250 nM for 3 months.

#### 3.3. HPLC-DAD-MS Analyses

An Agilent 1200 series HPLC system (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA) provided with a quaternary pump and a diode array detector (DAD) and controlled by the ChemStation software (version B.04.01) was used. The column was an Agilent Poroshell 120 EC-C18, 2.7 µm (4.6 mm × 150 mm) thermostatted at 35 °C. Solvents were (A) 0.1% formic acid in ultrapure water, and (B) acetonitrile, establishing the following elution gradient: 100% A in 10 min, 0–5% B in 10 min, 5–10% B in 15 min, 10–14.5% B in 20 min, and 14.5–60% B in 15 min, at a flow rate of 0.5 mL/min. Double detection was carried out in the diode array spectrophotometer and by mass spectrometry (MS), using 250 and 290 nM as preferred wavelengths for chromatogram recording. MS detection was performed on an API 3200 Qtrap (Applied Biosystems, Darmstadt, Germany) equipped with an

electrospray ionization probe (ESI) and a triple quadrupole mass analyzer that could also act as an ion trap, controlled by Analyst 5.1 software. Mass spectra were recorded in negative ion mode between  $m/z$  100 and 900. Zero air at 50 psi was used as a nebulizer, turbo gas at 500 °C and 40 psi for the elimination of the eluent, and nitrogen at 25 psi as a curtain and medium-collision gas. The method of full scan at high sensitivity (Enhanced MS, EMS) was used for data acquisition, followed by an analysis in Enhanced Product Ion (EPI) mode to obtain the characteristic fragmentation of the majority ion obtained in the first experiment. The EMS parameters were as follows: capillary voltage,  $-3500$  V; de-clustering potential (DP),  $-65$  V; entrance potential (EP),  $-10$  V; and collision energy (CE),  $-20$  V. The conditions in the EPI mode were: DP,  $-40$  V; EP,  $-8$  V; CE,  $-50$  V; and collision energy spread (CES),  $20$  V.

### 3.4. Semipreparative HPLC

The separation was performed with an Agilent 1260 Infinity LC equipment (Agilent Technologies, Waldbronn, Germany), consisting of a thermostatted autosampler, a binary system with two coupled preparative pumps, a diode array detector, and a collector thermostatic sampling, controlled by the OpenLab CDS Chemstation Workstation software (version C.01.04). An Agilent Prep-C18 column,  $5\ \mu\text{m}$  ( $21.2\ \text{mm} \times 150\ \text{mm}$ ) was used. The solvents were (A) 0.05% trifluoroacetic acid in ultrapure water, and (B) acetonitrile. The elution gradient was 100% A for 30 min, 0–5% B 10 min, 5–10% B for 20 min, 10–60% B for 5 min, using a flow rate of 15 mL/min. Chromatograms were acquired at 290 nM for peak collection.

### 3.5. NMR Analysis

The  $^1\text{H}$  nMR (400 MHz) and  $^{13}\text{C}$ -NMR (100 MHz) spectra of the isolated metabolites were measured in deuterated DMSO on a Bruker Avance DRX-400 spectrometer (Bruker Biospin GmbH, Rheinstetten, Germany) at 298 K. The resonances at 2.50 ppm of the residual in the  $^1\text{H}$  spectra and at 39.79 ppm for deuterated DMSO in the  $^{13}\text{C}$  spectra were used as internal references.  $^1\text{H}$  chemical shifts were assigned using one-dimensional (1D) and two-dimensional (2D)  $^1\text{H}$  nMR (correlation spectroscopy (COSY)), while  $^{13}\text{C}$  resonances were assigned using 2D nMR (heteronuclear multiple-bond correlation (HMBC) and heteronuclear multiple-quantum coherence (HMQC)). COSY, HMQC and HMBC plots are included as supplementary information in Figures S1–S3, respectively.

## 4. Conclusions

Protocatechuic acid monosulfates were synthesized, isolated, and characterized by HPLC-DAD-ESI/MS and nMR. Two compounds were obtained that were identified as PCA-4-sulfate and PCA-3-sulfate, respectively, based on their nMR and mass spectral characteristics. Compared to previously described procedures, the hemisynthesis method proposed herein is simpler, involving only a reaction step. The sulfation reagent (sulfur trioxide-*N*-triethylamine) and solvent used are easier to remove and safer, and the reaction kinetics is faster. The prepared metabolites are of great interest for their use in in vivo and in vitro studies, to contribute to the knowledge of the compounds and mechanisms involved in the biological effects of dietary polyphenols. The prepared PCA-sulfates and data that contributed to their analytical features, such as their differential MS fragmentation behavior and UV spectra, are also helpful as analytical standards for the identification of phenolic metabolites in samples of unknown composition.

**Supplementary Materials:** Supplementary nMR data are included in Figures S1–S3.

**Author Contributions:** S.M.G.-Z. and S.G.-M. performed the experiments and analyzed data; J.J.P.-A. performed nMR studies; A.M.G.-P. and C.S.-B. conceived and designed the study; and S.M.G.-Z. and C.S.-B. discussed the results and wrote the manuscript. All the authors have read and approved the final version.



**Funding:** Financial support for this work was obtained from the Spanish Government through the project AGL2015-64522-C2-R, from the FEDER-Interreg España-Portugal Program through the project 0377\_IBERPHENOL\_6\_E and from Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT, México) through a predoctoral fellowship to author S.M.G.Z.

**Conflicts of Interest:** The authors declare no conflict of interest.

## References

1. Crozier, A.; Jaganath, I.B.; Clifford, M.N. Dietary phenolics: Chemistry, bioavailability and effects on health. *Food Funct.* **2009**, *26*, 1001–1043. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
2. Valdés, L.; Cuervo, A.; Salazar, N.; Ruas-Madiedo, P.; Gueimonde, M.; González, S. The relationship between phenolic compounds from diet and microbiota: Impact on human health. *Food Funct.* **2015**, *6*, 2424–2439. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
3. Tomas-Barberan, F.A.; Selma, M.V.; Espín, J.C. Interactions of gut microbiota with dietary polyphenols and consequences to human health. *Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care* **2016**, *19*, 471–476. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
4. Williamson, G.; Clifford, M.N. Role of the small intestine, colon and microbiota in determining the metabolic fate of polyphenols. *Biochem. Pharmacol.* **2017**, *139*, 24–39. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
5. Rechner, A.R.; Kuhnle, G.; Bremner, P.; Hubbard, G.P.; Moore, K.P.; Rice-Evans, C.A. The metabolic fate of dietary polyphenols in humans. *Free Radic. Biol. Med.* **2002**, *33*, 220–235. [[CrossRef](#)]
6. Serra, A.; Macià, A.; Romero, M.A.; Reguant, J.; Ortega, N.; Motilva, M.J. Metabolic pathways of the colonic metabolism of flavonoids (flavonols, flavones and flavanones) and phenolic acids. *Food Chem.* **2012**, *130*, 383–393. [[CrossRef](#)]
7. Czank, C.; Cassidy, A.; Zhang, Q.; Morrison, D.J.; Preston, T.; Kroon, P.A.; Botting, N.P.; Kay, C.D. Human metabolism and elimination of the anthocyanin, cyanidin-3-glucoside: A <sup>13</sup>C-tracer study. *Am. J. Clin. Nutr.* **2013**, *97*, 995–1003. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
8. De Ferrars, R.M.; Cassidy, A.; Curtis, P.; Kay, C.D. Phenolic metabolites of anthocyanins following a dietary intervention study in post-menopausal women. *Mol. Nutr. Food Res.* **2014**, *58*, 490–502. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
9. De Ferrars, R.M.; Czank, C.; Zhang, Q.; Botting, N.P.; Kroon, P.A.; Cassidy, A.; Kay, C.D. The pharmacokinetics of anthocyanins and their metabolites in humans. *Br. J. Pharmacol.* **2014**, *171*, 3268–3282. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
10. Pimpão, R.C.; Ventura, M.R.; Ferreira, R.B.; Williamson, G.; Santos, C.N. Phenolic sulfates as new and highly abundant metabolites in human plasma after ingestion of a mixed berry fruit purée. *Br. J. Nutr.* **2015**, *113*, 454–463. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
11. Kakkar, S.; Bais, S. A review on protocatechuic acid and its pharmacological potential. *ISRN Pharmacol.* **2014**, *2014*, 952943. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
12. Khan, A.K.; Rashid, R.; Fatima, N.; Mahmood, S.; Mahmood, S.; Mir, S.; Khan, S.; Jabeen, N.; Murtaza, G. Pharmacological activities of protocatechuic acid. *Acta Pol. Pharm.* **2015**, *72*, 643–650. [[PubMed](#)]
13. Masella, R.; Santangelo, C.; D’Archivio, M.; LiVolti, G.; Giovannini, C.; Galvano, F. Protocatechuic acid and human disease prevention: Biological activities and molecular mechanisms. *Curr. Med. Chem.* **2012**, *19*, 2901–2917. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
14. Crozier, A.; Del Rio, D.; Clifford, M.N. Bioavailability of dietary flavonoids and phenolic compounds. *Mol. Asp. Med.* **2010**, *31*, 446–467. [[CrossRef](#)]
15. Del Rio, D.; Rodriguez-Mateos, A.; Spencer, J.P.; Tognolini, M.; Borges, G.; Crozier, A. Dietary (poly)phenolics in human health: Structures, bioavailability, and evidence of protective effects against chronic diseases. *Antioxid. Redox Signal.* **2013**, *18*, 1818–1892. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
16. Pimpão, R.C.; Dew, T.; Figueira, M.E.; McDougall, G.J.; Stewart, D.; Ferreira, R.B.; Santos, C.N.; Williamson, G. Urinary metabolite profiling identifies novel colonic metabolites and conjugates of phenolics in healthy volunteers. *Mol. Nutr. Food Res.* **2014**, *58*, 1414–1425. [[CrossRef](#)]
17. Amin, H.P.; Czank, C.; Raheem, S.; Zhang, Q.; Botting, N.P.; Cassidy, A.; Kay, C.D. Anthocyanins and their physiologically relevant metabolites alter the expression of IL-6 and VCAM-1 in CD40L and oxidized LDL challenged vascular endothelial cells. *Mol. Nutr. Food Res.* **2015**, *59*, 1095–1106. [[CrossRef](#)]
18. Warner, E.F.; Zhang, Q.; Raheem, K.S.; O’Hagan, D.; O’Connell, M.A.; Kay, C.D. Common phenolic metabolites of flavonoids, but not their unmetabolized precursors, reduce the secretion of vascular cellular adhesion molecules by human endothelial cells. *J. Nutr.* **2016**, *146*, 465–473. [[CrossRef](#)]



19. Di Gesso, J.L.; Kerr, J.S.; Zhang, Q.; Raheem, S.; Yalamanchili, S.K.; O'Hagan, D.; Kay, C.D.; O'Connell, M.A. Flavonoid metabolites reduce tumor necrosis factor- $\alpha$  secretion to a greater extent than their precursor compounds in human THP-1 monocytes. *Mol. Nutr. Food Res.* **2015**, *59*, 1143–1154. [[CrossRef](#)]
20. Zhang, Q.; Raheem, K.S.; Botting, N.P.; Slawin, A.M.Z.; Kay, C.D.; O'Hagan, D. Flavonoid metabolism: The synthesis of phenolic glucuronides and sulfates as candidate metabolites for bioactivity studies of dietary flavonoids. *Tetrahedron* **2012**, *68*, 4194–4420. [[CrossRef](#)]
21. Almeida, A.F.; Santos, C.N.; Ventura, M.R. Synthesis of new sulfated and glucuronated metabolites of dietary phenolic compounds identified in human biological samples. *J. Agric. Food Chem.* **2017**, *65*, 6460–6466. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
22. Gonzalez-Manzano, S.; González-Paramás, A.; Santos-Buelga, C.; Dueñas, M. Preparation and characterization of catechin sulfates, glucuronides, and methylethers with metabolic interest. *J. Agric. Food Chem.* **2009**, *57*, 1231–1238. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

**Sample Availability:** Samples of the compounds are available from the authors under request.



© 2019 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).



## REVIEW ARTICLE

## The Mechanisms Behind the Biological Activity of Flavonoids

Ana María González-Paramás, Begoña Ayuda-Durán, Sofía Martínez,  
Susana González-Manzano and Celestino Santos-Buelga\*

Área de Nutrición y Bromatología, Facultad de Farmacia, Universidad de Salamanca, Salamanca, Spain

**Abstract:** Flavonoids are phenolic compounds widely distributed in the human diet. Their intake has been associated with a decreased risk of different diseases such as cancer, immune dysfunction or coronary heart disease. However, the knowledge about the mechanisms behind their *in vivo* activity is limited and still under discussion. For years, their bioactivity was associated with the direct antioxidant and radical scavenging properties of phenolic compounds, but nowadays this assumption is unlikely to explain their putative health effects, or at least to be the only explanation for them. New hypotheses about possible mechanisms have been postulated, including the influence of the interaction of polyphenols and gut microbiota and also the possibility that flavonoids or their metabolites could modify gene expression or act as potential modulators of intracellular signaling cascades. This paper reviews all these topics, from the classical view as antioxidants in the context of the Oxidative Stress theory to the most recent tendencies related with the modulation of redox signaling pathways, modification of gene expression or interactions with the intestinal microbiota. The use of *C. elegans* as a model organism for the study of the molecular mechanisms involved in biological activity of flavonoids is also discussed.

## ARTICLE HISTORY

Received: February 14, 2018  
Revised: May 22, 2018  
Accepted: June 08, 2018

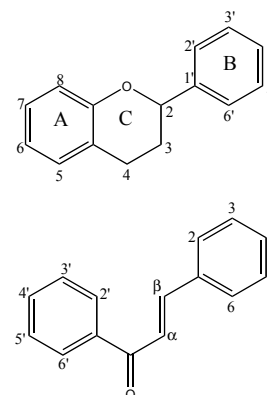
DOI:  
10.2174/0929867325666180706104829

**Keywords:** Flavonoids, health implications, bioavailability, metabolites, gut microbiota, antioxidant, gene expression, *C. elegans*.

## 1. INTRODUCTION

Flavonoids constitute one of the largest groups of plant secondary metabolites. They are phenolic compounds, synthesized through the shikimate/phenylpropanoid and acetate/malonate pathways, which possess a C6-C3-C6 skeleton, where two aromatic rings (A and B in Fig. 1a) are linked through a three-carbon chain that usually forms a closed pyran ring (ring C), configuring a phenylchromane arrangement. In a few cases, the C3 bridge does not conform a heterocyclic ring but occurs in an open form (chalcone form, Fig. 1b).

The Flavonoids can be divided into various classes based on the oxidation level of the ring C, being flavones, flavonols, flavan-3-ols, anthocyanins, flavanones, dihydroflavonols and isoflavones the most



**Fig. (1).** Basic structure of flavonoids: phenylchromane (a) and chalcone (b) forms.

important ones. The complete structures of more than 8000 naturally-occurring flavonoids have been described [1], although the number of reported compounds is continually increasing. They are widespread in higher plants and widely distributed in the human diet through cereals, pulses, fruits, vegetables and their derived products such as wine, tea or choco-

\*Address correspondence to this author at the Área de Nutrición y Bromatología, Facultad de Farmacia, Universidad de Salamanca, Salamanca, Spain; E-mail: csb@usal.es

late, in which they contribute to sensory, technological and health properties [2]. The intake of these phytochemicals largely varies depending on the country, season and dietary habits, especially related to the consumption of fruits and vegetables. A mean daily flavonoid intake of around one gram was firstly estimated by Kühnau in 1976 [3] although further estimations situate it below this amount, ranging between 140 mg per day in Brazilian population [4] to 350-450 mg/d in the US or different European countries [5-6].

Certain plants containing flavonoids have been used for thousands of years in traditional medicine, so the potential beneficial effects of these phytochemicals were known long before flavonoids were isolated as the effective compounds. In the earlier 1930's Japanese researches [7-8] described the therapeutic action of the flavones, but they received no general recognition until the Hungarian biochemist Albert Szent-Gyorgyi (Nobel Prize in Physiology and Medicine in 1937) and co-workers postulated in 1936 the role of two preparations from lemon peel, "citrin" and "eriodictin" in the treatment of abnormal capillary permeability and fragility [9]. The substances responsible for that activity were identified as flavonoids (flavones or flavonols) and tentatively classed as 'vitamin P' (for permeability). Nevertheless, their essential nature was never demonstrated, so that in 1950 the term vitamin P was finally dropped [10]. The interest for these compounds renewed in the 1990's with the observation of inverse epidemiological associations between the dietary intake of flavonoids and a reduced incidence and mortality from cardiovascular disease (CVD) [11-12]. Currently, numerous epidemiological, clinical and animal studies reveal that flavonoids may exert protective effects not only against cardiovascular disease but also on various disease conditions, including type II diabetes, cancer or neurodegenerative disorders such as Parkinson's [13]. Quite recently, several preclinical trials have pointed to the efficacy of some flavonoids to act as acetylcholinesterase inhibitors, suggesting the potential of these compounds for the symptomatic treatment of Alzheimer's disease [14].

Although the bioactivity of flavonoids has been widely substantiated, the knowledge about the mechanisms behind their *in vivo* activity is limited and still under discussion. The best described property of almost every group of flavonoids is their capacity to act as radical scavenging/antioxidant agents [15], however this activity has been usually established by *in vitro* methods, without considering the low bioavailability

and extensive conjugation that occur when the flavonoids are ingested. In fact, the low *in vivo* levels of flavonoids that have been determined for most flavonoids and their metabolites suggest that other mechanisms of action different from a direct antioxidant activity should exist.

This review discusses about the potential working mechanism of flavonoids, from the classical view as antioxidants in the context of the Oxidative Stress theory to the most recent tendencies related with the modulation of redox signaling pathways, modification of gene expression or interactions with the intestinal microbiota.

## 2. FLAVONOIDS AS ANTIOXIDANTS

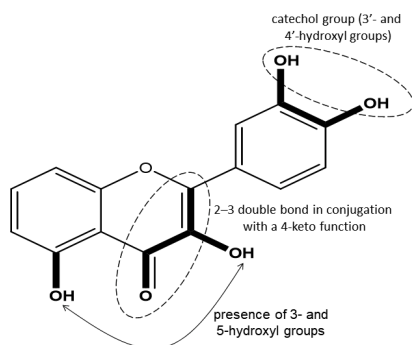
For years, most of the beneficial health effects of flavonoids were attributed to their antioxidant and chelating abilities. An antioxidant can be defined as "any substance that delays, prevents or removes oxidative damage to a target molecule" [16]. During normal metabolism, reactive oxygen and nitrogen species (RONS), such as hydroxyl ( $\text{OH}^{\bullet}$ ), superoxide ( $\text{O}_2^{\bullet-}$ ), nitric oxide ( $\text{NO}^{\bullet}$ ), nitrogen dioxide ( $\text{NO}_2^{\bullet}$ ), peroxy ( $\text{ROO}^{\bullet}$ ) and lipid peroxy ( $\text{LOO}^{\bullet}$ ) radicals are constantly formed and believed to contribute to cellular aging. Since Harman proposed in 1950 [17] that organisms age because they accumulate oxidative damage which comes from reactive oxygen species, and Sies formulated in 1985 the "Oxidative Stress theory", according to which the origin of major degenerative diseases could be explained by an imbalance in the dynamic equilibrium between pro-oxidants and antioxidants [18], it was assumed that antioxidants, and among them flavonoids, might help counteract this oxidative damage, thus contributing to the prevention of the age-related diseases.

The antioxidant capacity of flavonoids has been associated to their ability to act as effective scavengers of most types of oxidizing species, such as RONS, through mechanisms that involve the transfer of an H atom (HAT) or of a single electron (SET) to the radical stabilizing it, as well as to their metal chelating activity, as largely shown in *in vitro* studies [19]. Furthermore, *in vivo*, they could also act by indirect mechanisms like the activation of natural antioxidant defenses or the inhibition of oxidases [20].

### 2.1. Direct scavenging of ROS

Flavonoids are able to scavenge free radicals directly by hydrogen atom donation, a capacity that depends upon the total number of hydroxyl groups, the

substitution pattern and the arrangement of functional groups about the nuclear structure [21]. The presence of a catechol group in the B-ring is the most significant determinant for scavenging of RONS, owing to its ability to donate hydrogen, giving rise to a relatively stable flavonoid-derived radical (aroxyl radical) [22]. Further structural criteria for optimal scavenging activity are the presence of a 2,3-double bond conjugated with a 4-oxo function in the C-ring and a 3- (and 5-) hydroxy group (Fig. 2), as they provide extensive electron delocalisation over the three-ring system and confer higher stability to the produced radical [15, 23]. According to these criteria, quercetin and myricetin-derived flavonols have been indicated as the most effective radical scavengers in aqueous phase [24]. Some authors, however, have questioned the stability of the formed flavonoid aroxyl radicals, and have described their conversion into more reactive secondary radicals, such as quinones or semiquinones, that may give rise to pro-oxidant or potentially cytotoxic effects [25]. For instance, it has been shown that quercetin forms an o-semiquinone radical that can be disproportionated to produce o-quinones, as well as to react with  $O_2$  to form superoxide [26].



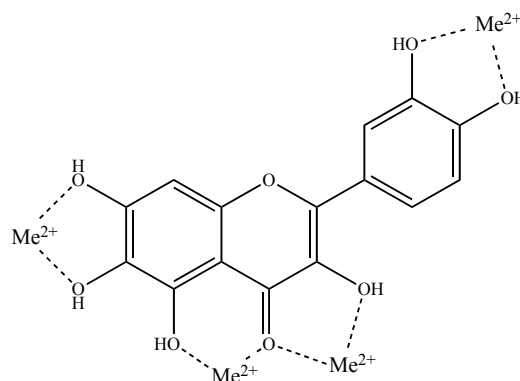
**Fig. (2).** Structural requirements associated with antioxidant activity of flavonoids as chain breaking antioxidants.

Polymerization of flavonoids, as it occurs in condensed tannins, further increases the antioxidant capacity due to the higher number of hydroxyl groups, whereas substitution of the hydroxyls (e.g. glycosylation or methylation) generally decreases the antioxidant potential compared to the parent molecules [15, 27].

## 2.2. Metal Chelating Activity

The ability of flavonoids to prevent the toxicity of redox active metal ions, such as iron, cobalt, manganese or copper has been less considered than their scavenging capacity. These cations are believed to catalyze the production of oxidant species leading to oxidation at different cellular levels (lipids, DNA or

proteins). Fe(II) catalyzes, in the presence of hydrogen peroxide, the formation of hydroxyl radical  $OH^\bullet$  by the Fenton reaction, whereas the reaction of Cu(II) with  $H_2O_2$  leads to the formation of both  $OH^\bullet$  and superoxide ( $O_2^{\bullet-}$ ) radicals [28]. Several flavonoids can form stable metal complexes through their multiple OH groups and the carbonyl moiety, whenever present, removing a causal factor for the development of free radicals [29]. Chelating complexes with divalent cations may be formed between the 3-OH or 5-OH and 4-oxo group, or between the 6- and 7-OH in A ring or 3'- and 4'-OH in B ring (Fig. 3) [30-31]; this process does not necessarily render the flavonoid inactive, as the complex retains ROS scavenging activity [32]. Both quercetin and rutin (*i.e.*, quercetin 3-*O*-rutinoside) possess iron-chelating and iron-stabilizing properties due to their potential binding sites ( $\alpha$ -hydroxy-carbonyl,  $\beta$ -hydroxy-carbonyl or ring-B catechol), suggesting little difference between aglycones and glycosides in the ability to complex metals [33]. The catechol moiety in the B ring has been shown to be the major contributory site for  $Cu^{2+}$ -chelate formation [34]. Several examples on the chelating activity of different flavonoids can be found in the papers by Cherrak *et al.* [28] and Leopoldini *et al.* [29].



**Fig. (3).** Structural requirements associated with antioxidant activity of flavonoids as metal chelators.

## 2.3. Ability to Regulate Enzymes Activities

Other possible mechanisms by which flavonoids can act is through the activation of endogenous defenses or the inhibition of enzymes responsible for superoxide production, such as oxidases.

The potential of different flavonoids to activate endogenous antioxidant enzymes, such as glutathione peroxidase (GPx), catalase (CAT) or superoxide dismutase (SOD) has been described by different authors [35-37]. SOD converts superoxide to  $H_2O_2$ , and CAT or peroxidases (*e.g.*, glutathione peroxidase or peroxidoxins) subsequently convert  $H_2O_2$  to water; peroxi-

dase activity can be further restored through reduction by either thioredoxin (TRX) or glutaredoxin.

Flavonoids can also induce phase II detoxifying enzymes (e.g. NAD(P)H-quinone oxidoreductase, glutathione S-transferase, and UDP-glucuronosyl transferase), which are the major enzymatic line of defense against electrophilic toxicants and oxidative stress [20]. It is known that most phase II genes generally contain cis-acting regulatory elements called the antioxidant response element (ARE) or electrophile-responsive element (EpRE) [38]. The induction of these elements may have origin in the putative toxicity of polyphenols. As commented before, in cellular media, flavonoids and other polyphenols can form potentially toxic quinones that are, themselves, substrates of antioxidant enzymes. That way the flavonoids could be able to activate these enzymes for their own detoxication and, thus, induce a general boosting of body defenses against toxic xenobiotics [39-40]. Flavonoids with a higher intrinsic potential to generate oxidative stress and redox cycling would be the most potent inducers of EpRE-mediated gene expression. Flavonoids containing a free hydroxyl group at position 3 in the ring C, such as quercetin and myricetin, have been indicated to be among the most effective inducers [41]. In the case of tea polyphenols, the presence of a 3-gallate group appears to be an important structural factor for the induction of ARE reporter genes, being epigallocatechin gallate (EGCG) the most active one [38].

Flavonoids are not only able to activate enzymatic defences but they can also regulate the oxidative status of the cell by inhibiting oxidative enzymes responsible for superoxide production, such as xanthine oxidase and protein K [42]. Flavonoids have been also shown to inhibit cyclooxygenase, lipoxygenase, microsomal succinoxidase and NADPH oxidase. NADPH oxidase is a membrane-associated system catalyzing the production of  $O_2^{\cdot-}$  in activated neutrophils. The inhibition of protein kinase C was suggested to be a mechanism of inhibition of NADPH by flavonoid molecules possessing a planar benzopyrone ring system with free hydroxyl substituents at the 3', 4' and 7-positions, such as quercetin, fisetin or luteolin [43].

The interference of flavonoids with nitric oxide-synthase (NOS) activity is another potential mechanism to decrease oxidative damage in the cell. NO, produced by the oxidation of L-arginine catalyzed by NO synthases, interacts with free radicals, especially  $O_2^{\cdot-}$ , producing peroxynitrites. Although it is not clearly understood yet how flavonoids inhibit induction of NOS and NO production, they would possess ability to directly

scavenge molecules of both NO and peroxynitrite once produced. Furthermore, the scavenging ability of flavonoids may hinder the reaction of free radicals with NO, thus resulting in less damage [44]. The most significant determinant for their activity against peroxynitrite is again the presence of a 3',4'-catechol arrangement, followed by an unsubstituted 3-hydroxyl group [45].

#### 2.4. Interaction of Flavonoids with Other Antioxidants

$\alpha$ -Tocopherol ( $\alpha$ T) is one of the major lipid-soluble antioxidants in blood, tissues, cell membranes and human low-density lipoprotein (LDL) and it is thought to have an important function in the prevention of degenerative diseases. This compound can scavenge reactive species, originating the corresponding  $\alpha$ -T $^{\cdot-}$  radical. Several studies support the notion of a regeneration of  $\alpha$ -T from its  $\alpha$ -tocopheroxyl radical at water-lipid interfaces by dietary flavonoids [46]. In particular, the potential of both flavonols and catechins to delay the oxidation of LDL has been pointed out [47].

The recycling of the aroxyl radicals has also been proposed to explain the interactions between flavonoids and other antioxidants, such as ascorbate. Flavonoids that possess a catechol group in the B-ring and a double bond at position 2-3 in the C-ring, such as quercetin, would have a higher redox potential ( $E_7 = 0,33$  V) than ascorbate ( $E_7 = 0,28$  V), thus being capable of oxidizing it to the ascorbyl radical [31], which may be further enzymatically reduced or disproportionate to the non-radical form [48].

Despite the abundant literature about the antioxidant capacity of flavonoids, it is necessary to consider that the compounds of this family are, in general, little bioavailable and largely biotransformed in the organism, so that their levels as such in body fluids, tissues and cells are usually very low and well below those of other physiological antioxidants, like urate,  $\alpha$ -tocopherol, ascorbate or glutathione [49].

Interestingly, significant increases in the serum levels of uric acid, the major contributor to plasma total antioxidant capacity, after consumption of flavonoid-rich foods, such as strawberries, spinach or red wine, have been reported [50], although the mechanisms why this effect is produced are not clear. What seems clear is that the notion of these compounds acting as 'systemic' antioxidants and as conventional hydrogen donors is unlikely to be the sole explanation for their putative health effects [1].

Nowadays, other hypotheses, such as the possibility that flavonoids could act as potential modulators of intracellular signaling cascades vital to cellular function independent of their classical antioxidant capacity, are considered more accurate to explain the *in vivo* activity of flavonoids [51].

### 3. BIOAVAILABILITY OF FLAVONOIDS

Bioavailability can be defined as “the rate and extent to which an active ingredient or active moiety is absorbed from a matrix and becomes available at the site of action”. Based on this, the rate of absorption and the availability at the site of action look like the most importance parameters for a flavonoid to be effective within biological systems. The bioavailability of flavonoids is generally low and can vary dramatically among different flavonoid classes, as well as for individual compounds in a particular class [52]. It has been estimated that less than 5-10% of the consumed flavonoids may be absorbed in the small intestine to be further conjugated in the intestinal wall, the liver and peripheral tissues, so that they will be found in plasma in the form of conjugated metabolites (glucuronides, sulfates and methylated derivatives) [53]. Thus, the compounds able to reach the metabolic targets are chemically and, in many instances, functionally distinct from the consumed forms, and such features underlie their bioactivity [54].

In general, the absorption of flavonoids in the digestive tract starts in the ileum (Fig. 4). Except for flavan-

3-ols (*i.e.*, catechins and proanthocyanidins), these compounds mostly exist in plants and foods as glycosides, which cannot be generally absorbed in their native form. Some glycosides, however, can be hydrolyzed by the enzyme lactase phloridzin hydrolase (LPH) in the intestinal epithelium to release the aglycone, which can enter the enterocyte by passive diffusion because of its increased lipophilicity [55]. There is still controversy about the possibility of an active transport of some particular glycosides into epithelial cells by the active sodium-dependent glucose transporter SGLT1 and the subsequent hydrolysis in the cell by a cytosolic  $\beta$ -glucosidase (CBG) [55-56]. It has also been described that hydrolysis of some flavonoid glycosides might already occur in the oral cavity, as both saliva and oral microbiota show  $\beta$ -glucosidase activity [57]. Compounds with large molecular weight, like polymeric proanthocyanidins, would not be absorbed, while oligomeric proanthocyanidins (dimers, trimers) could be absorbed in the small intestine without previous degradation to lower molecular weight compounds [58]. *In vitro* digestion assays have also suggested that some flavonoids (*e.g.*, procyanidin B1 or anthocyanins) might be also absorbed in a small percentage under the acidic conditions of the stomach [59].

Once absorbed, the flavonoids interact with phase II enzymes, catechol-o-methyltransferase (COMT), UDP-glucuronosyltransferase (UGT) and sulfotransferase, already in the enterocytes and further in the liver and peripheral tissues, to produce conjugated metabolites that will be found circulating in plasma. Except for par-

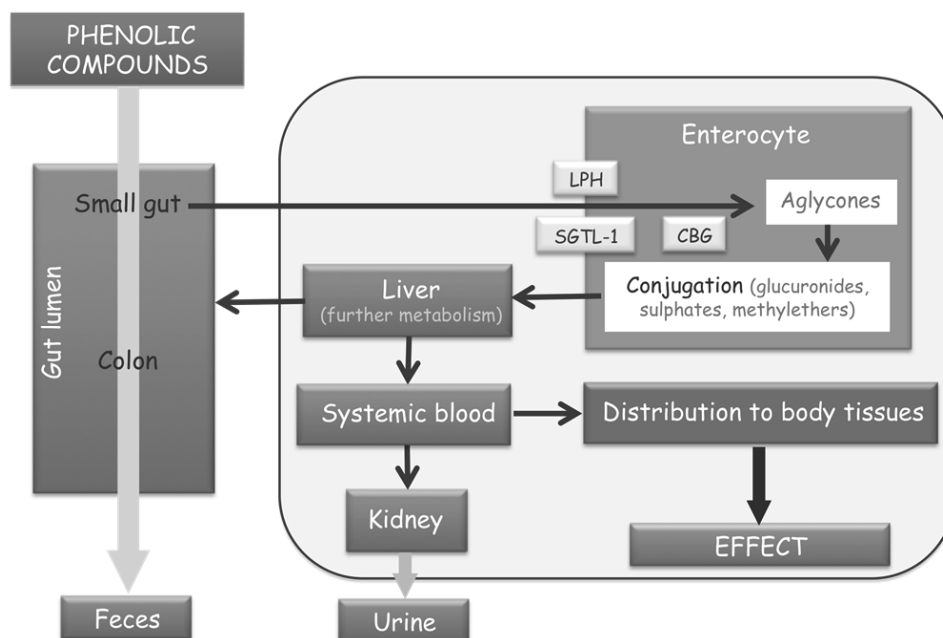


Fig. (4). Scheme of flavonoid metabolism.

ticular flavonoids, like some catechins or certain isoflavones, aglycones are not found as such in the blood [60-61]. It has been suggested that whilst methylation and glucuronidation are produced in both intestinal cells and liver, sulfation would mainly take place in the liver [62]. This metabolic conversion is known to be a major factor affecting flavonoid bioavailability. After conversions in the liver, enterohepatic transport in the bile would also occur and some metabolites are recycled back to the small intestine. Additionally, the conjugated metabolites, especially glucuronide derivatives, can be pumped out into the gut lumen to participate in enteric, and local recycling by efflux transporters such as multidrug resistance-associated proteins (MRPs) and breast cancer resistance protein (BCRP), decreasing in this way even more the bioavailability of polyphenols and limiting their exposure to target organs [63]. A simplified scheme of human metabolism of flavonoids is presented in Fig. (4).

Due to this extensive metabolic process, the final concentration of flavonoid metabolites that can be found in human plasma are in the nanomolar to low micromolar range, and at least ten times lesser amount of aglycones [53]. As above indicated, even at the highest levels reported, the plasmatic concentrations of flavonoids and their conjugated metabolites are far below those of other physiological antioxidants [49], therefore a direct antioxidant effect might be only expected in tissues directly exposed to polyphenols, like the gastrointestinal tract. On the other hand, the process of conjugation involves a decrease in the antioxidant potential of the flavonoids, due to the substitution of the active hydroxyl groups [64].

Some authors have, however, suggested that flavonoids may overcome the challenges posed by their poor bioavailability and decreased activity of their conjugated metabolites, through their accumulation in some body compartments, in view of their capacity to establish H-bonds and hydrophobic interactions with biomembranes [48]. Furthermore, in some tissues [65] or under some physiological situations, such as inflammation [66], deconjugation of the glucuronidated and sulfated forms of flavonoids can occur, so that aglycones and/or their methylated derivatives may be released in some target sites, contributing to the *in vivo* effects of dietary flavonoids [67-69].

Whatever the effects of the compounds absorbed in the small intestine, the large majority of the flavonoids from the oral intake go to the large intestine, where they interact with the gut microflora. Currently these interactions are a major item of interest to explain a

relevant part of the potential healthy effects that flavonoids and polyphenols in general may have in the human organism.

#### 4. INTERACTIONS WITH GUT MICROBIOTA

Most of the consumed flavonoids, those that are not absorbed in the small intestine or are recycled after metabolism, are reaching the large intestine where they interact with and may be metabolized by the colonic microflora. Bacterial enzymes may catalyze a wide variety of reactions that occur under anaerobic conditions and are based mainly on processes of reduction and/or hydrolysis, such as dehydroxylation, demethylation, decarboxylation, reduction of double bonds, hydrolysis of glucuronides, sulfates and glycosides, or ring cleavage [20]. In most flavonoid groups, this latter would take place in the heterocyclic C-ring, but cleavage of the aromatic ring A may also occur in flavan-3-ols. The enzymatic cleavage of C-C bonds in flavonoids appears to be characteristic of gut microbiota [70].

It is well established that some gut bacteria, especially some *Clostridium* species, can catabolize flavonols. Deglycosylation could take place as a first step of the metabolism, as observed in *in vitro* digestion assays of quercetin glycosides in the presence of rat microflora [71]. After deglycosylation, a breakdown of the C-ring may occur (breaking the bond between the 1- and 2- or 2- and 3-positions) followed by dehydroxylation, leading to the formation of simpler compounds, such as phenolic acids and aldehydes [71]. It has been shown that human intestinal bacteria, such as *Eubacterium ramulus* and *Flavonifractor plautii* (formerly *Clostridium orbiscindens*), are also able to produce the reduction of the double bond in the 2,3- position of the C-ring in quercetin, resulting in the formation of the dihydroflavonol taxifolin, which is further isomerized to the auronol alphonin by a unique C-ring contraction, and suffer C-ring oxidative cleavage to produce 3,4-dihydroxyphenylacetic acid and phloroglucinol, the latter undergoing further degradation to butyrate and acetate [72]. 3,4-Dihydroxyphenylacetic acid would be degraded into 3,4-dihydroxybenzoic acid (protocatechuic acid, usually the main metabolite in the fermentation media) and subsequently into hydroxybenzoic acid [71]. Other products from the colonic degradation of flavonols that have been described are 3-(3,4-dihydroxyphenyl) propionic acid and 3-(3-hydroxyphenyl) propionic acid resulting from the A ring [73]. The formation of homovanillic acid, found in urine and other body fluids, has been explained by *O*-methylation of 3,4-dihydroxyphenylacetic acid in the



liver after microbial metabolism of quercetin [74]. Indeed, methylation and other conjugation reactions would further take place in the liver after microbial metabolism, as such derivatives have not been observed in the *in vitro* faecal or caecal incubations [75].

Bacterial metabolism of anthocyanins also involves the cleavage of glycosidic linkages and breakdown of the anthocyanidin heterocycle to release B-ring- and A-ring-derived products. Protocatechuic acid has been described as a major metabolite corresponding to the B-ring fragment in the case of cyanidin-derived anthocyanins, while the A-ring generates 2,4,6-trihydroxybenzaldehyde that could further be converted to phloroglucinol [76-77]. A wide range of metabolites was detected in serum and urine by Czank *et al.* (2013) [78] after cyanidin-3-glucoside intake by human volunteers, including phenolic, hippuric, phenylacetic, and phenylpropenoic acids, some of them conjugated with glucuronic acid and sulfate.

Catechins and oligomeric proanthocyanidins undergo the opening of the C-ring followed by different reactions, like lactonization, decarboxylation, dehydroxylation or oxidation. Phenyl- $\gamma$ -valerolactones and phenylvaleric acids have been described as exclusive microbial metabolites of flavan-3-ols. Phenylvaleric acids would be subsequently biotransformed by successive loss of carbon atoms to give rise to different phenylacetic, phenylpropionic and hydroxybenzoic acids, and in minor extension to hippuric, vanillic and homovanillic acids by further conjugation [79-80].

Other flavonoids families, such as flavanones, are found to be less degraded by the colonic microbiota. Similar to other flavonoids, flavanone glycosides suffer first a deglycosylation to render the aglycone, which through C-ring cleavage gives rise to 3-(3,4-dihydroxyphenyl)propionic acid and sometimes phloroglucinol [81].

Multiple examples of the catabolism of flavonoids and schematic representations of the different processes can be found in the reviews by Del Rio (2013) [13] Stevens (2016) [70] and Selma (2009) [72].

It is important to remark that there is a great interindividual variation both in the amount and the profile of phenolic metabolites produced after flavonoids intake [82]. These differences could be attributed, at least in part, to the existence in the human gut microbiome of the so-called “enterotypes”, which are defined as a network of co-abundant microbial populations dominated by the prominent presence of one of these three genera: *Ruminococcus*, *Bacteroides* and *Prevotella*

[83], but also due to differences in minority microbial groups related to phenolic metabolism phenotypes (“metabotypes”). The term gut metabotype refers to a metabolic phenotype with specific gut microbiome-derived metabolites that characterize the metabolism of the parent compound. In this regard, a gut metabotype is defined not only by the resulting metabolites but also by the associated gut microbiota both in terms of composition and activity [84].

After the catabolism process, many of the produced catabolites could be efficiently absorbed in the colon, appear in the blood and be transformed by human cell enzymes into phase II conjugates, including methylethers, glucuronides and sulfates, to be ultimately excreted in the urine. Since microbial catabolites and their conjugate derivatives may be present at many sites of the body in higher concentration than the parent compounds, it has been proposed that at least a part of the biological activities ascribed to flavonoids could be due to their colonic catabolites [78, 80].

On the other hand, it is accepted that phenolic compounds and their metabolites may impact on gut microbiota inducing prebiotic-like effects on bacteria [85]. It has been postulated that dietary polyphenols could exert, at least in part, their health effects through changes in the composition of the gut microbiota. Some *in vitro* and *in vivo* studies (humans, pigs, sheep) have suggested that flavonoids or their catabolites might, for example, increase the proportion of bifidobacteria and eubacteria without inhibiting lactic acid bacteria, suppress bacteroides and pathogenic *Clostridium perfringens* and *Clostridium difficile*, or lower the colonic pH value [86-87].

## 5. CAENORHABDITIS ELEGANS AS A MODEL TO STUDY FLAVONOIDS BIOACTIVITY

Nowadays, there is an accepted view that if flavonoids have any preventive or curative activity through their ingestion, it must involve not only their antioxidant potential, but also the modulation of different signaling pathways, such as phosphoinositide 3-kinase, Akt/protein kinase B, mitogen-activated protein kinase, tyrosine kinases, and protein kinase C, that are crucial in the pathogenesis of several diseases [51, 88]. In addition, flavonoids could also modulate various genes expression through activation of diverse transcription factors. Due to their flexibility, model organisms like zebrafish, *Drosophila melanogaster* or the nematode *Caenorhabditis elegans* are increasingly used to perform studies related with genes or cellular pathways.

*Caenorhabditis elegans* is a well characterized *in vivo* model organism whose genome has been fully sequenced and many of its gene functions characterized by generating mutant strains. It has been widely used because of its easy culture and handling under laboratory conditions, being maintained from 12 to 25 °C on agar with *Escherichia coli* as feed. Besides, approximately 60-80% of *C. elegans* genes have human orthologues, and the presence of tissue and organ systems raises the possibility to consider the metabolism of compounds. Its relatively short lifespan (15-22 days at 25 °C) makes it useful in longevity studies [89-91]. Furthermore, facilities such as information about genes function are available in the wormbase page (<http://www.wormbase.org>).

This nematode has been used for studying the influence of different flavonoids on the process of ageing (lifespan and oxidative stress).

Some authors have found that catechins are able to extend life duration in wild-type N2 *C. elegans* [92-94], while others did not observe lifespan extension for these flavonoids, although they found it for their methylated metabolites [95]. On the other hand, feeding of the worms with apple polyphenols mainly containing procyanidins, consisting of (epi)catechin units, was reported to increase mean lifespan in wild-type N2 strain and *fem-1* mutants [96]

Significant increases in worm lifespan were also observed for flavonols, like quercetin [97]. In these compounds, the hydroxylation pattern of ring B seems to play a crucial role, the greater the number of hydroxyl groups, the greater the effect: myricetin > quercetin > kaempferol (reviewed by [98]). Lifespan effects are also influenced by aglycone glycosylation and methylation. Greater increase in mean and maximum life duration was produced for isorhamnetin 3-*O*-methylquercetin than for quercetin in worms fed at the same compound doses (200 µM); however, similar life extension was found for tamarixetin (4-*O*-methylquercetin) and quercetin [97]. The treatment with quercetin-3-*O*-glucoside increased *C. elegans* life at low concentrations (10-25 µM), whereas exposure to greater doses (50-200 µM), at which quercetin showed life extending effects, caused lifespan reduction, suggesting a hormetic response [99]. The type of sugar residue also seems to be important for the biological effects of flavonols; thus, homo-disaccharides (glucose-glucose) were indicated to increase longevity in wild type worms, while hetero-disaccharides (glucose-rhamnose) could no prolong lifespan [100]. This differential behavior could be explained by differences in

compound bioavailability, with some glycosides being more efficiently taken up by the nematode than quercetin, to be further deglycosylated, so that higher amounts of the aglycone were accumulated in the worm organism, than following exposure to quercetin itself [99]. These findings suggested that deglycosylation was a key step in the lifespan effects of flavonols and that the aglycone would be the actual responsible for the observed biological activity, as also observed in other *ex vivo* and animal models [101].

Numerous studies have also been conducted in *C. elegans* in order to evaluate the influence of flavonoids on the oxidative stress and the putative mechanisms behind such effects. Flavonoids have the potential to modulate intracellular oxidative stress directly by scavenging free radicals, reducing reactive oxygen species (ROS) basal level and modulating the activity of antioxidant enzymes such as SOD-3, CAT and glutathione-S-transferase (GST) [102-103]. These protective effects were also observed in *C. elegans* submitted to either thermal or oxidative stress and treated with flavonols such as quercetin, myricetin or kaempferol [97, 102], or catechins [95, 104-105], demonstrating the capacity of flavonoids to improve the survival rates of worms under stress conditions.

Studies using different mutant strains have shown that the mechanisms underlying the lifespan and antioxidant effects might differ depending on the flavonoid [106]. Using mutant nematode strains lacking the function of key genes involved in the insulin/IGF-1 signaling pathway, has been a way to study the potential of flavonoids to mediate stress tolerance and extend lifespan [98]. The insulin/insulin like growth factor (IGF-1) signaling pathway is an evolutionary conserved mechanism that influences longevity and metabolism throughout different species. The *daf-2* gene encodes for a receptor tyrosine kinase and is the only member of the insulin receptor family in *C. elegans*. The initiation of the cascade depends on the phosphorylation of DAF-2 (Fig. 5). The inhibition of the DAF-2 pathway avoids phosphorylation and leads to nuclear localization and activation of the transcription factors (DAF-16/FoxO, HSF-1, SKN-1/Nrf2), which changes the expression of various genes responsible for endogenous stress-response, development, metabolism and longevity [91].

Interestingly, none of the flavonoids or extract tested prolonged further the lifespan in the long-live mutant strain *daf-2* [92, 107]. The results obtained in relation to other genes of the same pathway differ depending on the flavonoid. Quercetin did not prolong

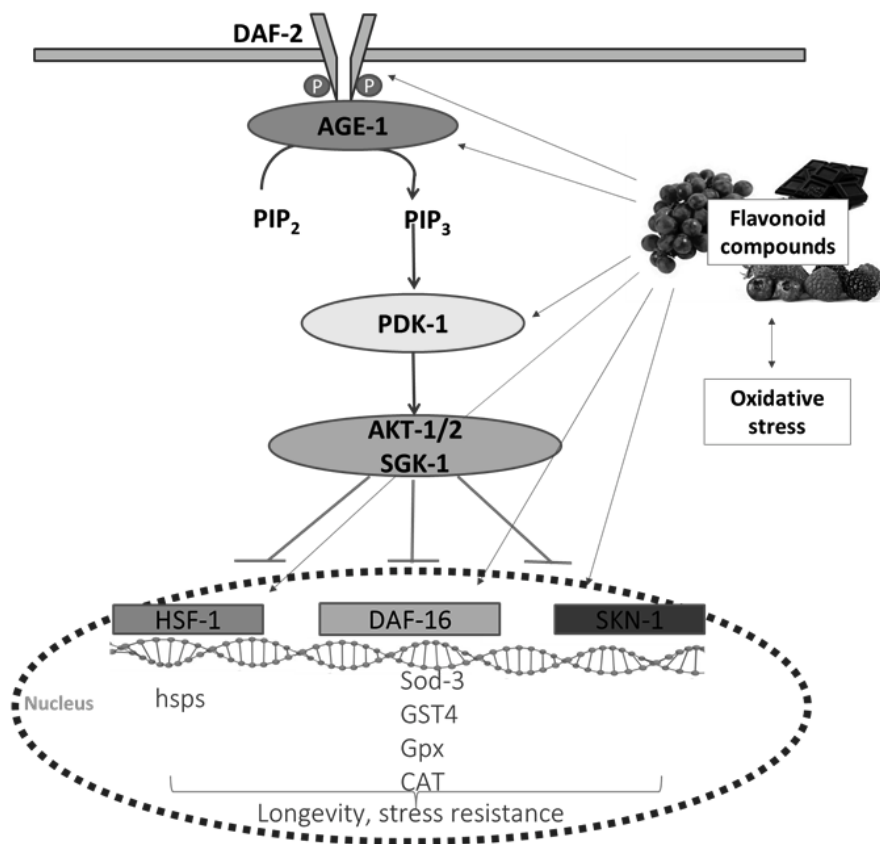


Fig. (5). Abbreviated scheme of the insulin/IGF-1 signaling pathway.

the lifespan of the mutant strain *age-1* (the orthologue of the phosphoinositide 3-kinase (PI3K) in mammals and a central component insulin-like signaling pathway in *C. elegans*) [107], while catechin increased lifespan in the same mutant [92]. By contrast, catechin, but not quercetin, failed to increase lifespan in the *akt-2* mutant [92, 107]; *akt-2* gene encodes for a homologue of the serine/threonine kinase Akt/PKB, AKT-2, and its inactivation causes animals to arrest constitutively at the dauer stage, while having an increased lifespan.

DAF-16 is the *C. elegans* transcription factor homologue to the forkhead box O (FoxO) in the insulin/IGF-1-mediated signaling (IIS) pathway. This factor was found to be essential for lifespan regulation in the action of kaempferol and myricetin, but not for quercetin or catechin [92, 107-108]. DAF-16 has also been related to the increased resistance of *C. elegans* against H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced stress provided by cocoa polyphenols [109], as well as in the decrease in ROS levels in nematodes exposed to myricetin [95]. However, the lowering effect of quercetin and kaempferol on mitochondrial ROS level was observed to be independent of DAF-16 [102].

The *mev-1* gene encodes for the *C. elegans* orthologue of the succinate dehydrogenase cytochrome b560 subunit, and *mev-1* mutations result in abnormal energy metabolism and increased sensitivity to oxidative stress and pathogen infection. It has been shown that epigallocatechin-3,*O*-gallate [94] and myricetin [102] were able to prolong lifespan in *mev-1* mutants, whereas catechin [92], quercetin, kaempferol and naringenin did not [102, 107].

Studies in different mutant strains revealed that *sek-1* and *unc-43* genes, related to MAP kinase and calmodulin-dependent protein kinase pathways, could be key players in quercetin mediated longevity in *C. elegans*. [107, 110]. SEK-1 is required for the resistance to oxidative stress by assisting the translocation of cytoplasmic DAF-16 into the nucleus.

In *C. elegans*, members of the HSP-16 protein family are known to be involved in thermotolerance and are suggested as predictors for longevity [111]. Different flavonoids have been shown to be able to modulate HSP-16.2 expression induced either thermally or chemically by treatment with the stressor juglone [105, 112-113].

Several authors have also demonstrated that flavonoids possess the ability to increase the expression of *skn-1* and to induce the SKN-1 translocation into the nucleus [92, 113]. This transcription factor is the *C. elegans* homologue of the nuclear factor erythroid-2-related factor 2 (Nrf2) that regulates the gene expression of phase II detoxifying enzymes and antioxidant proteins, such as SOD, GST or NAD(P)H:quinone oxidoreductase (NQO-1). Under physiological conditions in mammals, Nrf2 is bound to Keap1, which retains Nrf2 in the cytoplasm. Oxidative stress induces dissociation of the Nrf2-Keap1 complex and subsequent translocation of Nrf2 into the nucleus, where it binds to antioxidant response elements (ARE) in the promoter region of genes encoding phase II enzymes and antioxidant proteins leading to a changed expression profile [114]. However, this mechanism seems not to be common for all the flavonoids, for instance, the gene expression of *skn-1* appears not to be involved in myricetin, catechin or procyanidins mediated longevity in *C. elegans* [92, 108].

### CONCLUDING REMARKS

Notable advances have been made over the last two decades in the knowledge of flavonoids bioavailability and metabolism; however, little is still known about the actual and more active metabolites responsible for their biological effects and the molecular mechanisms finally involved in their activity. It is now accepted that the classical assumption of flavonoids as antioxidants is unlikely to explain their putative health effects, or at least to be the only explanation for them. The interaction with gut microbiota and the possibility that flavonoids or their metabolites could act as potential modulators of intracellular signaling cascades vital to cellular functions are hypotheses that are now gaining place. The studies available in these respects are, however, partial and inconclusive, and point to that not all flavonoids act through the same action mechanisms and on the same molecular targets, but different metabolites and genes may be involved in their biological effects. Further progresses should be expected in the coming years favored by the use of the novel omics approaches (especially transcriptomics and metabolomics) and model organisms like *C. elegans*, and the increased knowledge on human microbiome and its influence on flavonoids/polyphenols metabolism and activity.

### CONSENT FOR PUBLICATION

Not applicable.

### FUNDING

Thanks are due to the Spanish MINECO (Project AGL2015-64522-C2-02) and FEDER-Interreg España-Portugal Programme (Project ref. 0377\_IBERPHENOL\_6\_E) by financial support. B.A-D is recipient of a PhD fellowship from the Junta de Castilla y Leon (Orden EDU/310/2015).

### CONFLICT OF INTEREST

The authors declare no conflict of interest, financial or otherwise.

### ACKNOWLEDGEMENTS

Declared none.

### REFERENCES

- [1] Andersen, Ø.M.; Markham, K.R. *Flavonoids: Chemistry, Biochemistry and Applications*; CRC Press: Boca Raton, FL, 2006.
- [2] Santos-Buelga, C.; González-Paramás, A.M. Flavonoids: Functions, Metabolism and Biotechnology In: *Industrial Biotechnology of Vitamins, Biopigments, and Antioxidants*; Vandamme and Revuelta, Eds.; Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA: Weinheim, Germany, 2016; pp. 469-495.
- [3] Kühnau, J. The flavonoids. A class of semi-essential food components: their role in human nutrition. *World Rev. Nutr. Diet.*, 1976, 24, 117-191
- [4] Correa, V.G.; Tureck, C.; Locateli, G.; Peralta, R.M.; Koehnlein, E.A.A. Estimate of consumption of phenolic compounds by Brazilian population. *Rev. Nutr.*, 2015, 28, 185-196.
- [5] Bai, W.; Wang, C.; Ren, C. Intakes of total and individual flavonoids by US adults. *Int. J. Food Sci. Nutr.*, 2014, 65, 9-20.
- [6] Wang, X.; Ouyang, Y.Y.; Liu, J.; Zhao, G. Flavonoid intake and risk of CVD: a systematic review and meta-analysis of prospective cohort studies. *Br. J. Nutr.*, 2014, 111, 1, 1-11.
- [7] Akamatsu, K. Über die Wirkung der Flavonole auf das Froschhens. *Ber. Physiol*, 1931, 62, 443.
- [8] Fukuda, T. Über die pharmakologische wirkung der flavonverbindungen. *Archiv F. Experiment. Pathol. u. Pharmakol*, 1932, 164, 685-694.
- [9] Benthath, A.; Ruzsnyak, S.T.; Szent-György, A. Vitamin nature of flavones, *Nature*, 1936, 138, 798.
- [10] Anonymous. Use of the term Vitamin P. *Nature*, 1950, 166, 543.
- [11] Hertog, M.G.; Feskens, E.J.; Hollman, P.C.; Katan, M.B.; Kromhout, D. Dietary antioxidant flavonoids and risk of coronary heart disease: The Zutphen elderly study. *Lancet*, 1993, 342, 1007-1011.
- [12] Hertog, M.G.; Kromhout, D.; Aravanis, C.; Blackburn, H.; Buzina, R.; Fidanza, F.; Giampaoli, S.; Jansen, A.; Menotti, A.; Nedeljkovic, S.; Pekkarinen, M.; Simic, B.S.; Toshima, H.; Feskens, E.J.M.; Hollman, P.C.H.; Katan, M.B. Flavonoid intake and long-term risk of coronary heart disease and cancer in the seven countries study. *Arch. Intern. Med.*, 1995, 155, 381-386.
- [13] Del Rio, D.; Rodriguez-Mateos, A.; Spencer, J.P.E.; Tognolini, M.; Borges, G.; Crozier, A. Dietary (poly)phenolics in human health: structures, bioavailability, and evidence of

- protective effects against chronic diseases. *Antioxid. Redox Signal.*, 2013, 8, 1818–1892.
- [14] Khan, H.; Marya, Amin, S.; Kamal, M.A.; Patel, S. Flavonoids as acetylcholinesterase inhibitors: Current therapeutic standing and future prospects. *Biomed. Pharmacother.*, 2018, 101, 860–870.
- [15] Heim, K.E.; Tagliaferro, A.R.; Bobilya, D.J. Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships. *J. Nutr. Biochem.*, 2002, 13, 572–584.
- [16] Halliwell B, Gutteridge JMC. *Free radicals in biology and medicine*. third ed. Oxford University Press: Oxford, 1998.
- [17] Harman, D. Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry. *J. Gerontol.*, 1956, 11, 298–300.
- [18] Sies, H. Oxidative stress: introductory remarks In: *Oxidative Stress*; Sies H. Ed.; Academic Press: London, 1985; pp. 1–8.
- [19] Trembl, J.; Šmejkal, K. Flavonoids as potent scavengers of Hydroxyl radicals. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.*, 2016, 720–738.
- [20] Procházková, D.; Boušová, I.; Wilhelmová, N. Antioxidant and prooxidant properties of flavonoids. *Fitoterapia*, 2011, 82, 513–523.
- [21] Kumar, S.; Pandey, A.K. Chemistry and biological activities of flavonoids: an overview. *Sci. World J.*, 2013, Article ID 162750.
- [22] Bors, W.; Michel, C.; Stettmaier, K. Antioxidant effects of flavonoids. *BioFactors*, 1997, 6, 399–402.
- [23] Bors, W.; Heller, W.; Michel, C.; Saran, M. Flavonoids as antioxidants: determination of radical scavenging efficiencies. *Methods Enzymol.*, 1990, 186, 343–355.
- [24] Rice-Evans, C.A.; Miller, N.J.; Paganga, G. Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Radic Biol Med.*, 1996, 20, 933–56.
- [25] Halliwell, B. Are polyphenols antioxidants or pro-oxidants? What do we learn from cell culture and *in vivo* studies? *Arch. Biochem. Biophys.*, 2008, 476, 107–112.
- [26] Metodiewa, D.; Jaiswal, A.K.; Cenas, N.; Dickanaité, E.; Segura-Aguilar, J. Quercetin may act as a cytotoxic prooxidant after its metabolic activation to semiquinone and quinoidal product. *Free Radic. Biol. Med.*, 1999, 26, 107–116.
- [27] Dueñas, M.; González-Manzano, S.; González-Paramás, A.; Santos-Buelga, C. Antioxidant evaluation of O-methylated metabolites of catechin, epicatechin and quercetin. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 2010, 51, 443–449.
- [28] Cherrak, S.A.; Mokhtari-Soulimane, N.; Berroukeche, F.; Benseneane, B.; Cherbonnel, A.; Merzouk, H.; Elhabiri, M. *In vitro* antioxidant versus metal ion chelating properties of flavonoids: A structure-activity investigation. *PLoS ONE*, 2016, 11(10): e0165575.
- [29] Leopoldini, M.; Russo, N.; Toscano, M. The molecular basis of working mechanism of natural polyphenolic antioxidants. *Food Chem.*, 2011, 125, 288–306.
- [30] Cheng, I.F.; Breen, K. On the ability of four flavonoids, baicalein, luteolin, naringenin, and quercetin, to suppress the Fenton reaction of the iron-ATP complex. *Biometals*, 2000, 13, 77–83.
- [31] Pietta, P.G. Flavonoids as antioxidants. *J. Nat. Prod.*, 2000, 63, 1035–42.
- [32] Arora, A.; Nair, M.G.; Strasburg, G.M. Structure-activity relationships for antioxidant activities of a series of flavonoids in a liposomal system. *Free Radic. Biol. Med.*, 1998, 24, 1355–1363.
- [33] Soczynska-Kordala, M.; Bakowska, A.; Oszmianski, J.; Gabrielska, J. Metal ion-flavonoid associations in bilayer phospholipid membranes, *Cell Mol. Biol. Lett.*, 2001, 6, 277–281.
- [34] Brown, J.E., Khodr, H.; Hider, R.C.; Rice-Evans, C. Structural dependence of flavonoid interactions with  $\text{Cu}^{2+}$  ions: implications for their antioxidant properties. *Biochem. J.*, 1998, 330, 1173–1178.
- [35] Nagata, H.; Takekoshi, S.; Takagi, T.; Honma, T.; Watanabe, K. Antioxidative action of flavonoids, quercetin and catechin, mediated by the activation of glutathione peroxidase. *Tokai J Exp Clin Med*, 1999, 24, 1–11.
- [36] Masella, R.; Di Benedetto, R.; Vari, R.; Filesi, C.; Giovannini, C. Novel mechanisms of natural antioxidant compounds in biological systems: involvement of glutathione and glutathione-related enzymes. *J. Nutr. Biochem.*, 2005, 16, 577–86.
- [37] González-Manzano, S.; González-Paramás, A.M.; Delgado, L.; Patianna, S.; Surco-Laos, F.; Dueñas, M.; Santos-Buelga, C. Oxidative status of stressed *Caenorhabditis elegans* treated with epicatechin. *J. Agric. Food Chem.*, 2012, 60, 8911–8916.
- [38] Chen, Ch.; Yu, R.; Owuor, E.D.; Tony Kong, A.N. Activation of Antioxidant-Response Element (ARE), Mitogen Activated Protein Kinases (MAPKs) and Caspases by Major Green Tea Polyphenol Components during Cell Survival and Death. *Arch. Pharm. Res.*, 2000, 23, 605–612.
- [39] Scalbert, A.; Manach, C.; Morand, C.; Remesy, C.; Jimenez, L. Dietary polyphenols and the prevention of diseases. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, 2005, 45, 287–306.
- [40] Tang, S.Y.; Halliwell, B. Medicinal plants and antioxidants: what do we learn from cell culture and *Caenorhabditis elegans* studies? *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2010, 394, 1–5.
- [41] Lee-Hilz, Y.Y.; Boerboom, A.M.J.F.; Westphal, A.H.; van Berkel, W.J.H.; Aarts, J.M.M.J.G.; Rietjens, I.M.C.M. Prooxidant activity of flavonoids induces EpRE-mediated gene expression. *Chem. Res. Toxicol.*, 2006, 19, 1499–505.
- [42] Nijveldt, R.J.; van Nood, E.; van Hoorn, D.E.C.; Boelens, P.G.; van Norren, K.; van Leeuwen, P.A.M. Flavonoids: a review of probable mechanisms of action and potential applications. *Am. J. Clin. Nutr.*, 2001, 74, 418–25.
- [43] Ferriola, P.C.; Cody, V.; Middleton, E. Protein kinase C inhibition by plant flavonoids: kinetic mechanisms and structure-activity relationships. *Biochem. Pharmacol.*, 1989, 38, 1617–24.
- [44] Hertzog, D.I.; Tica, O-S. Molecular mechanisms underlying the anti-cancerous action of flavonoids. *Current Health Sci. J.*, 2012, 38, 145–149.
- [45] Choi, J.S.; Chung, H.Y.; Kang, S.S.; Jung, M.J.; Kim, J.W.; No, J.K.; Jung, H. A. The structure-activity relationship of flavonoids as scavengers of peroxynitrite. *Phytother. Res.*, 2002, 16, 232–235.
- [46] Frank, J.; Budek, A.; Lundh, T.; Parker, R.S.; Swanson, J.E.; Lourenço, C.F.; Gago, B.; Laranjinha, J.; Vessby, B.; Kamal-Eldin A. Dietary flavonoids with a catechol structure increase alpha-tocopherol in rats and protect the vitamin from oxidation *in vitro*. *J. Lipid Res.*, 2006, 47, 2718–2725.
- [47] Zhu, Q.Y.; Huang, Y.; Chen, Z.Y. Interaction between flavonoids and  $\alpha$ -tocopherol in human low density lipoprotein. *J. Nutr. Biochem.*, 2000, 11, 14–21.
- [48] Laranjinha, J. Translation of Chemical Properties of Polyphenols into Biological Activity with Impact on Human Health In: *Recent Advances in Polyphenols Research*, Santos-Buelga, C.; Escribano, M.T.; Lattanzio V. Eds.; Wiley-Blackwell: Chichester, 2010; Vol. 2, pp.269–282.
- [49] Hollman, P.C.H. Unravelling of the health effects of polyphenols is a complex puzzle complicated by metabolism. *Arch. Biochem. Biophys.*, 2014, 559, 100–105.
- [50] Cao, G.; Russell, R.M.; Lischner, N.; Prior, R.L. Serum antioxidant capacity is increased by consumption of strawberries, spinach, red wine or vitamin C in elderly women. *J. Nutr.*, 1998, 128, 2383–2390.

- [51] Williams, R.J.; Spencer, J.P.; Rice-Evans, C. Flavonoids: antioxidants or signalling molecules? *Free Radic. Biol. Med.*, 2004, *36*, 838-49.
- [52] Thilakarathna, S.H.; Rupasinghe, H.P.V. Flavonoid bioavailability and attempts for bioavailability enhancement. *Nutrients*, 2013, *5*, 3367-3387.
- [53] Clifford, M.N. Diet-derived phenols in plasma and tissues and their implications for health. *Planta Med.*, 2004, *70*, 1103-1114.
- [54] Kroon, P.A.; Clifford, M.N.; Crozier, A.; Day, A.J.; Donovan, J.L.; Manach, C.; Williamson, G. How should we assess the effects of exposure to dietary polyphenols *in vitro*? *Am. J. Clin. Nutr.*, 2004, *80*, 15-21.
- [55] Day, A. J.; Gee, J.M.; Dupont, M.S.; Johnson, I.T.; Williamson, G. (2003). Absorption of quercetin-3-glucoside and quercetin-4'-glucoside in the rat small intestine: the role of lactase phlorizin hydrolase and the sodium-dependent glucose transporter. *Biochem. Pharmacol.*, 2003, *65*, 1199-1206.
- [56] Kottra, G.; Daniel, H. Flavonoid glycosides are not transported by the human Na<sup>+</sup>/glucose transporter when expressed in *Xenopus laevis* oocytes, but effectively inhibit electrogenic glucose uptake. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 2007, *322*, 829-35.
- [57] Requena, T.; Monagas, M.; Pozo-Bayón, M.A.; Martín-Álvarez, P.J.; Bartolomé, B.; del Campo, R.; Ávila, M.; Martínez-Cuesta, M.C.; Peláez, C.; Moreno-Arribas, M.V. Perspectives of the potential implications of wine polyphenols on human oral and gut microbiota. *Trends Food Sci. Technol.*, 2010, *21*, 332-344.
- [58] Shoji, T.; Masumoto, S.; Moriichi, N. Apple proanthocyanidin oligomers absorption in rats after oral administration: Analysis of proanthocyanidins in plasma using the porter method and high-performance liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *J. Agric. Food Chem.*, 2006, *54*, 884-892.
- [59] Ariza, M.T.; Reboredo-Rodríguez, P.; Cervantes, L.; Soria, C.; Martínez-Ferri, E.; González-Barreiro, C.; Cancho-Grande, B.; Battino, M.; Simal-Gándara, J. Bioaccessibility and potential bioavailability of phenolic compounds from achenes as a new target for strawberry breeding programs. *Food Chem.*, 2018, *248*, 155-165.
- [60] Terao, J. Flavonols: metabolism, bioavailability, and health impacts In: *Plant Phenolics and Human Health: Biochemistry, Nutrition, and Pharmacology*; C. G. Fraga Ed.; John Wiley & Sons, Inc.: Hoboken, NJ, USA.; 2009, pp.185-196.
- [61] Poquet, L.; Clifford, M. N.; Williamson, G. Bioavailability of Flavanols and Phenolic Acids In: *Plant Phenolics and Human Health: Biochemistry, Nutrition, and Pharmacology*; C. G. Fraga Ed.; John Wiley & Sons, Inc.: Hoboken, NJ, USA.; 2009, pp.51-89.
- [62] Scalbert, A.; Williamson, G. Dietary intake and bioavailability of polyphenols. *J. Nutr.*, 2000, *130*, 2073S-2085S.
- [63] Zhang, X.; Dong, D.; Wang, H.; Ma, Z.; Wang, Y.; Wu, B. Stable knock-down of efflux transporters leads to reduced glucuronidation in UGT1A1-overexpressing HeLa cells: the evidence for glucuronidation-transport interplay. *Mol Pharm.*, 2015, *12*, 1268-1278.
- [64] Dueñas, M.; Surco-Laos, F.; González-Manzano, S.; González-Paramás, A.M.; Santos-Buelga, C. Antioxidant properties of major metabolites of quercetin. *Eur Food Res Technol*, 2011, *232*, 103-111.
- [65] O'Leary, K.A.; Day, A.J.; Needs, P.W.; Sly, W.S.; O'Brien, N.M.; Williamson, G. Flavonoid glucuronides are substrates for human liver  $\beta$ -glucuronidase. *FEBS Letters*, 2001, *503*, 103-106.
- [66] Shimoi, K.; Saka, N.; Nozawa, R.; Sato, M.; Amano, I.; Nakayama, T.; Kinai, N. Deglucuronidation of a flavonoid, luteolin monoglucuronide, during inflammation. *Drug Metab. Dispos.*, 2001, *29*, 1521-1524.
- [67] Lee-Hilz, Y.Y.; Stolaki, M.; van Berkel, W.J.; Aarts, J.M.; Rietjens, I.M. Activation of EpRE-mediated gene transcription by quercetin glucuronides depends on their deconjugation. *Food Chem. Toxicol.*, 2008, *46*, 2128-2134.
- [68] Terao, J.; Murota, K.; Kawai, Y. Conjugated quercetin glucuronides as bioactive metabolites and precursors of aglycone *in vivo*. *Food Funct.*, 2011, *2*, 11-17.
- [69] Menendez, C.; Duenas, M.; Galindo, P.; Gonzalez-Manzano, S.; Jimenez, R.; Moreno, L.; Zarzuelo, M.J.; Rodríguez-Gómez, I.; Duarte, J.; Santos-Buelga, C.; Perez-Vizcaino, F. Vascular deconjugation of quercetin glucuronide: the flavonoid paradox revealed? *Mol. Nutr. Food Res.*, 2011, *55*, 1780-1790.
- [70] Stevens, J.F.; Maie, C.S. The chemistry of gut microbial metabolism of polyphenols. *Phytochem. Rev.*, 2016, *15*, 425-444.
- [71] Serra, A.; Macià, A.; Romero, M.P.; Reguant, J.; Ortega, N.; Motilva, M.J. Metabolic pathways of the colonic metabolism of flavonoids (flavonols, flavones and flavanones) and phenolic acids. *Food Chem.*, 2012, *130*, 383-393.
- [72] Braune, A.; Engst, W.; Elsinghorst, P.W.; Furtmann, N.; Bajorath, J.; Gütschow, M.; Blaut, M. Chalcone isomerase from *Eubacterium ramulus* catalyzes the ring contraction of flavanones. *J. Bacteriol.*, 2016, *198*, 2965-2974.
- [73] Selma, M.V.; Espín, J.C.; Tomás-Barberán, F.A. Interaction between phenolics and gut microbiota: role in human health. *J. Agric. Food Chem.*, 2009, *57*, 6485-501.
- [74] Aura, A.M.; O'Leary, K.A.; Williamson, G.; Ojala, M.; Bailey, M.; Puupponen-Pimia, R.; Nuutila, A.M.; Oksman-Caldentey, K.M.; Poutanen, K. Quercetin derivatives are deconjugated and converted to hydroxyphenylacetic acids but not methylated by human fecal microflora *in vitro*. *J. Agric. Food Chem.*, 2002, *50*, 1725-1730.
- [75] Aura, A.M. Microbial metabolism of dietary phenolic compounds in the colon. *Phytochem. Rev.*, 2008, *7*, 407-429.
- [76] Aura, A.M.; Martín-Lopez, P.; O'Leary, K.A.; Williamson, G.; Oksman-Caldentey, K.M.; Poutanen, K.; Santos-Buelga, C. *In vitro* metabolism of anthocyanins by human gut microflora. *Eur. J. Nutr.*, 2005, *44*, 133-142.
- [77] Fleschhut, J.; Kratzer, F.; Reckemmer, G.; Kulling, S.E. Stability and biotransformation of various dietary anthocyanins *in vitro*. *Eur. J. Nutr.*, 2006, *45*, 7-18.
- [78] Czank, C.; Cassidy, A.; Zhang, Q.; Morrison, D.J.; Preston, T.; Kroon, P.A.; Botting, N.P.; Kay, C.D. Human metabolism and elimination of the anthocyanin, cyanidin-3-glucoside: a <sup>13</sup>C-tracer study. *Am. J. Clin. Nutr.*, 2013, *97*, 995-1003.
- [79] Moco, S.; Martin, F.P.; Rezzi, S. Metabolomics view on gut microbiome modulation by polyphenol-rich foods. *J. Proteome Res.*, 2012, *11*, 4781-4790
- [80] Williamson, G.; Clifford, M.N. Colonic metabolites of berry polyphenols: the missing link to biological activity? *Br. J. Nutr.*, 2010, *104*, S48-S66.
- [81] Rechner, A.R.; Smith, M.A.; Kuhnle, G.; Gibson, G.R.; Debnam, E.S.; Srail, S.K.; Moore, K.P.; Rice-Evans, C.A. Colonic metabolism of dietary polyphenols: Influence of structure on microbial fermentation products. *Free Radical Biol. Med.*, 2004, *36*, 212-225.
- [82] Feliciano, R.P.; Istas, G.; Heiss, C.; Rodriguez-Mateos, A. Plasma and urinary phenolic profiles after acute and repetitive intake of wild blueberry. *Molecules*, 2016, *21*, 1120.
- [83] Arumugam, M.; Raes, J.; Pelletier, E.; Le Paslier, D.; Yamada, T.; Mende, D.R.; Fernandes, G.R.; Tap, J.; Bruls, T.; Batto, J.M.; Bertalan, M.; Borruel, N.; Casellas, F.; Fernandez, L.; Gautier, L.; Hansen, T.; Hattori, M.; Hayashi, T.; Kleerebezem, M.; Kurokawa, K.; Leclerc, M.; Levenez, F.;

- Manichanh, C.; Nielsen, H.B.; Nielsen, T.; Pons, N.; Poullain, J.; Qin, J.; Sicheritz-Ponten, T.; Tims, S.; Torrents, D.; Ugarte, E.; Zoetendal, E.G.; Wang, J.; Guarner, F.; Pedersen, O.; de Vos, W.M.; Brunak, S.; Doré, J.; MetaHIT Consortium; Antolín, M.; Artiguenave, F.; Blottiere, H.M.; Almeida, M.; Brechot, C.; Cara, C.; Chervaux, C.; Cultrone, A.; Delorme, C.; Denariáz, G.; Dervyn, R.; Foerster, K.U.; Friss, C.; van de Guchte, M.; Guedon, E.; Haimet, F.; Huber, W.; van Hylckama-Vlieg, J.; Jamet, A.; Juste, C.; Kaci, G.; Knol, J.; Lakhdari, O.; Layec, S.; Le Roux, K.; Maguin, E.; Mérieux, A.; Melo Minardi, R.; M'rini, C.; Muller, J.; Oozeer, R.; Parkhill, J.; Renault, P.; Rescigno, M.; Sanchez, N.; Sunagawa, S.; Torrejon, A.; Turner, K.; Vandemeulebrouck, G.; Varela, E.; Winogradsky, Y.; Zeller, G.; Weissenbach, J.; Ehrlich, S.D.; Bork, P. Enterotypes of the human gut microbiome. *Nature*, 2011, *473*, 174-180.
- [84] Espín, J.C.; González-Sarriás, A.; Tomás-Barberán, F.A. The gut microbiota: A key factor in the therapeutic effects of (poly)phenols. *Biochem. Pharmacol.*, 2017, *139*, 82-93.
- [85] Cueva, C.; Gil-Sánchez, I.; Ayuda-Durán, B.; González-Manzano, S.; González-Paramás, A.M.; Santos-Buelga, C.; Bartolomé, B.; Moreno-Arribas, M.V. An integrated view of the effects of wine polyphenols and their relevant metabolites on gut and host health. *Molecules*, 2017, *22*, 99.
- [86] Lee, H.C.; Jenner, A.M.; Low, C.S.; Lee, Y.K. Effect of tea phenolics and their aromatic fecal bacterial metabolites on intestinal microbiota. *Res. Microbiol.*, 2006, *157*, 876-884.
- [87] Okubo, T.; Ishihara, N.; Oura, A.; Serit, M.; Kim, M.; Yamamoto, T.; Mitsuoka, T. *In vivo* effect of tea polyphenol intake on human intestinal microflora and metabolism. *BioSci. Biotechnol. Biochem.*, 1992, *56*, 588-591.
- [88] Mansuri, M.L.; Parihar, P.; Solanki, I.; Parihar, M.S. Flavonoids in modulation of cell survival signalling pathways. *Genes Nutr.*, 2014, *9*:400.
- [89] The *C. elegans* Sequencing Consortium. Genome sequence of the nematode *C. elegans*: a platform for investigating biology. *Science*, 1998, *282*, 2012-2018.
- [90] Tissenbaum, H.A. Genetics, life span, health span, and the aging process in *Caenorhabditis elegans*. *J. Gerontol. A Biol. Sci. Med. Sci.*, 2012, *67*, 503-510.
- [91] Wormbook: the online review of *C. elegans* biology. <http://www.wormbook.org/> (Accessed January 20, 2018).
- [92] Saul, N.; Pietsch, K.; Menzel, R.; Stürzenbaum, S. R.; Steinberg, C.E.W. Catechin induced longevity in *C. elegans*: from key regulator genes to disposable soma. *Mech. Ageing Dev.*, 2009, *130*, 477-486.
- [93] Saul, N.; Pietsch, K.; Stürzenbaum, S.R.; Menzel, R.; Steinberg, C.E. Diversity of polyphenol action in *Caenorhabditis elegans*: between toxicity and longevity. *J. Nat. Prod.*, 2011, *74*, 1713-1720.
- [94] Bartholome, A.; Kampkötter, A.; Tanner, S.; Sies, H.; Klotz, L.O. Epigallocatechin gallate-induced modulation of FoxO signaling in mammalian cells and *C. elegans*: FoxO stimulation is masked via PI3K/Akt activation by hydrogen peroxide formed in cell culture. *Arch. Biochem. Biophys.*, 2010, *501*, 58-64.
- [95] Surco-Laos, F.; Duenas, M.; Gonzalez-Manzano, S.; Cabello, J.; Santos-Buelga, C.; González-Paramás, A.M. Influence of catechins and their methylated metabolites on lifespan and resistance to oxidative and thermal stress of *Caenorhabditis elegans* and epicatechin uptake. *Food Res Int.*, 2012, *46*, 514-521.
- [96] Sunagawa, T.; Shimizu, T.; Kanda, T.; Tagashira, M.; Sami, M.; Shirasawa, T. Procyanidins from apples (*Malus pumila* Mill.) extend the lifespan of *Caenorhabditis elegans*. *Planta Med.*, 2011, *77*, 122-127.
- [97] Surco-Laos, F.; Cabello, J.; Gómez-Orte, E.; González-Manzano, S.; González-Paramás, A.M.; Santos-Buelga, C.; Dueñas, M. Effects of O-methylated metabolites of quercetin on oxidative stress, thermotolerance, lifespan and bioavailability on *Caenorhabditis elegans*. *Food Funct.*, 2011, *2*, 445-456.
- [98] Koch, K.; Havermann, S.; Büchter, C.; Wätjen, W. *Caenorhabditis elegans* as model system in pharmacology and toxicology: Effects of flavonoids on redox-sensitive signalling pathways and ageing. *Sci. World J.*, 2014, 2014: 920398.
- [99] Dueñas, M.; Surco-Laos, F.; González-Manzano, S.; González-Paramás, A.M.; Gómez-Orte, E.; Cabello, J.; Santos-Buelga, C. Deglycosylation is a key step in biotransformation and lifespan effects of quercetin-3-O-glucoside in *Caenorhabditis elegans*. *Pharmacol. Res.*, 2013, *76*, 41-48.
- [100] Ahn, D.; Lee, E.B.; Kim, B.J.; Lee, S.Y.; Lee, T.G.; Ahn, M-S; Lim, H.W.; Cha, D.S.; Jeon, H.; Kim, D.K. Antioxidant and lifespan extending property of quercetin-3-O-dirhamnoside from *Curcuma longa* L. in *Caenorhabditis elegans*. *J Korean Soc Appl Biol Chem*, 2014, *57*, 709-714.
- [101] Perez-Vizcaino, F.; Duarte, J.; Santos-Buelga, C. The flavonoid paradox: conjugation and deconjugation as key steps for the biological activity of flavonoids. *J. Sci. Food Agric.*, 2012, *92*, 1822-1825.
- [102] Grünz, G.; Haas, K.; Soukup, S.; Klingenspor, M.; Kulling, S.E.; Daniel, H.; Spanier, B. Structural features and bioavailability of four flavonoids and their implications for lifespan-extending and antioxidant actions in *C. elegans*. *Mech. Ageing Dev.*, 2012, *133*, 1-10.
- [103] Kampkötter, A.; Timpel, C.; Zurawski, R.F.; Ruhl, S.; Chovolou, Y.; Proksch, P.; Wätjen, W. Increase of stress resistance and lifespan of *Caenorhabditis elegans* by quercetin. *Comp. Biochem. Physiol. B Biochem. Mol. Biol.*, 2008, *149*, 314-323.
- [104] González-Manzano, S.; González-Paramás, A.M.; Delgado, L.; Patianna, S.; Surco-Laos, F.; Dueñas, M.; Santos-Buelga, C. Oxidative status of stressed *Caenorhabditis elegans* treated with epicatechin. *J. Agric. Food Chem.*, 2012, *60*, 8911-8916.
- [105] Abbas, S.; Wink, M. Epigallocatechin gallate from green tea (*Camellia sinensis*) increases lifespan and stress resistance in *Caenorhabditis elegans*. *Planta Med.*, 2009, *75*, 216-221.
- [106] Pallauf, K.; Duckstein, N.; Rimbach, G. A literature review of flavonoids and lifespan in model organisms. *Proc Nutr Soc.*, 2017, *76*, 145-162.
- [107] Pietsch, K.; Saul, N.; Chakrabarti, S.; Stürzenbaum, S.R.; Menzel, R.; Steinberg, C.E. Hormetins, antioxidants and prooxidants: defining quercetin-, caffeic acid- and rosmarinic acid-mediated life extension in *C. elegans*. *Biogerontology*, 2011, *12*, 329-47.
- [108] Büchter, C.; Ackermann, D.; Havermann, S.; Honnen, S.; Chovolou, Y.; Fritz, G.; Kampkötter, A.; Wätjen, W. Myricetin-mediated lifespan extension in *Caenorhabditis elegans* is modulated by DAF-16. *Int. J. Mol. Sci.*, 2013, *14*, 11895-11914.
- [109] Martorell, P.; Forment, J. V.; De Llanos, R.; Montón, F.; Llopis, S.; González, N.; Genovés, S.; Cienfuegos, E.; Monzó, H.; Ramón, D. Use of *Saccharomyces cerevisiae* and *Caenorhabditis elegans* as model organisms to study the effect of cocoa polyphenols in the resistance to oxidative stress. *J. Agric. Food Chem.*, 2011, *59*, 2077-2085.
- [110] Pietsch, K.; Saul, N.; Menzel, R.; Stürzenbaum, S.R.; Steinberg, C.E. Quercetin mediated lifespan extension in *Caenorhabditis elegans* is modulated by age-1, daf-2, sek-1 and unc-43. *Biogerontology*, 2009, *10*, 565-578.

- [111] Mendenhall, A.R.; Tedesco, P.M.; Taylor, L.D.; Lowe, A.; Cypser, J. R.; Johnson, T. E. Expression of a single-copy hsp-16.2 reporter predicts life span. *J. Gerontol: Series A*, 2012, *67*, 726–733.
- [112] Strayer, A.; Wu, Z.; Christen, Y.; Link, C.D.; Luo, Y. Expression of the small heat-shock protein Hsp16-2 in *Caenorhabditis elegans* is suppressed by Ginkgo biloba extract EGb 761. *FASEB J.*, 2003, *17*, 2305–2307.
- [113] Zhang, L.; Jie, G.; Zhang, J.; Zhao, B. Significant longevity extending effects of EGCG on *Caenorhabditis elegans* under stress. *Free Radicals Biol. Med.*, 2009, *46*, 414–421.
- [114] Surh, Y.J.; Kundu, J. K.; Na, H.K. Nrf2 as a master redox switch in turning on the cellular signaling involved in the induction of cytoprotective genes by some chemopreventive phytochemicals. *Planta Med.*, 2008, *74*, 1526–1539.

DISCLAIMER: The above article has been published in Epub (ahead of print) on the basis of the materials provided by the author. The Editorial Department reserves the right to make minor modifications for further improvement of the manuscript.

**PMID: 29984643**